

**KINETIK DER PROTEINSYNTHESE IM MYOKARD
POST MORTEM UND VERÄNDERUNG DER
MYOKARDIALEN GENEXPRESSION BEI
HERZMUSKELHYPERTROPHIE - REGRESSION
UNTER NIFEDIPIN - THERAPIE**

BIRGIT DANNINGER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0056

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK I DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. MED. GERHARD RIECKER

Kinetik der Proteinsynthese im Myokard post mortem

und

Veränderung der myokardialen Genexpression

bei Herzmuskelhypertrophie - Regression

unter Nifedipin - Therapie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Birgit Danninger

aus

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter : PD Dr. med. Josef Zähringer

Mitberichterstatter : 1. Prof. Dr. med. Gerhard Riecker
Med. Klinik I der Universität
2. Prof. Dr. med. Max Eder
Patholog. Institut

Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 12.02.1987

I. EINLEITUNG

1. Grundzüge der Genexpression in der eukaryonten Zelle und ihrer Bedeutung für die Regulation der Proteinsynthese
 - 1.1. Transskription 1
 - 1.2. Translation 3
 - 1.3. Mitochondriale Proteinsynthese 5
2. Organspezifische Besonderheiten von Genexpression und Proteinsynthese im Myokard
 - 2.1. Allgemeines 6
 - 2.2. Intrazelluläre Organisation der myokardialen Proteinsynthese 7
3. Isolierung und Charakterisierung myokardialer Polyribosomen und mRNS als Parameter der myokardialen Genexpression 8
4. Biochemische Veränderungen im hypertrophierenden Herzmuskel sowie bei Herzmuskelhypertrophie-Regression
 - 4.1. Herzmuskelhypertrophie 10
 - 4.2. Herzmuskelhypertrophie-Regression 15

II. UNTERSUCHUNGSZIELE

Beziehung der myokardialen Genexpression und Proteinsynthese zu Veränderungen der Funktionslage des Herzens:

1. Kinetik der Proteinsynthese im Myokard post mortem 24
2. Veränderung der myokardialen Genexpression bei Herzmuskelhypertrophie-Regression unter antihypertensiver Therapie mit Nifedipin 24

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Postmortale Kinetik der Proteinsynthese	25
1.1. Tiermodell	25
1.2. Chemikalien	25
1.3. Isolierung von intakter Gesamt-RNS aus Rattenherzen	26
1.4. BRL-in vitro-Translation der in der Gesamt-RNS-Fraktion enthaltenen mRNS in Proteine	27
1.5. Identifizierung der zellfrei synthetisierten Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Slabgelen	27
1.6. Hybridisierungssassay myokardialer mRNS an (³ H)Poly(U)	28
1.7. Auftrennung der niedermolekularen Gesamt-RNS auf Formamid-Gelen und Identifizierung der Poly(A)-Sequenzlänge der myokardialen mRNS durch Hybridisierung	30
2. Veränderung der myokardialen Genexpression bei Herzmuskelhypertrophie-Regression unter Nifedipin-Therapie	
2.1. Tiermodell	31
2.2. Chemikalien	31
2.3. Isolierung myokardialer Gesamt-RNS aus Herzmuskelbiopsien spontan hypertensiver Ratten	31
2.4. Quantifizierung der myokardialen mRNS im Hybridisierungsassay	32
2.5. Verschiedenes	32

IV. ERGEBNISSE

1. Kinetik der Proteinsynthese im Myokard post mortem	33
1.1. Isolierung myokardialer Gesamt-RNS	33
1.2. Ergebnisse der BRL-in vitro-Translation der myokardialen Gesamt-RNS	37
1.3. Identifizierung der neu synthetisierten Proteine	40

1.4. Quantifizierung myokardialer mRNA im Hybridisierungsassay	44
1.5. Auftrennung der Gesamt-RNS auf Formamidgelen und Identifizierung der Poly(A)-Sequenzlänge myokardialer mRNA	47
1.6. Diskussion	50
1.7. Zusammenfassung	55
2. Veränderung der myokardialen Genexpression bei Herzmuskelhypertrophie-Regression unter Nifedipin-Therapie	
2.1. Veränderung des systolischen Blutdruckes sowie des linksventrikulären Herzgewichtes unter Nifedipin	57
2.2. Isolierung myokardialer mRNA und Quantifizierung im Hybridisierungsassay	60
2.3. Veränderung der myokardialen Protein-/DNS- und RNS-Konzentrationen	62
2.4. Diskussion	65
2.5. Zusammenfassung	72
Danksagungen	73
V. LITERATURVERZEICHNIS	74
VI. LEBENSLAUF	85
VII. ABKÜRZUNGEN	86

1. EINLEITUNG

1. Grundzüge der Genexpression in der eukaryonten Zelle und ihrer Bedeutung für die Regulation der Proteinsynthese

Basierend auf den klassischen Untersuchungen von Watson und Crick (1953) und Jakob und Monod (1961) haben in den letzten Jahrzehnten zahlreiche experimentelle Arbeiten dazu beigetragen, die Mechanismen der Genexpression in eukaryonten Zellen aufzuklären.

Diese in Abbildung 1 in einer Übersicht schematisch dargestellte Organisation der Genexpression soll in ihren wichtigsten Schritten im folgenden näher erläutert werden.

1.1. Transskription

Die genetische Information der Zelle, in der DNS des Zellkernes gespeichert, liegt dort in Form einzelner Transskriptionsabschnitte, sog. Transcripts, vor. Jedes dieser Transcripts, die bis zu einer Anzahl von 2×10^5 in einer Zelle enthalten sind, besteht aus einer oder mehreren codierenden DNS-Sequenzen, die sowohl voneinander durch nicht-codierende, strukturelle DNS-Sequenzen getrennt sind, als auch in sich DNS-Sequenzen ohne codierende Information, sog. Introns, enthalten können, welche Teile der einzelnen Gene voneinander trennen.

Eine Koppelung dieser einzelnen genetisch codierenden Sequenzen zu einer funktionellen Einheit findet erst mit der Transformation der heteronukleären RNS (HnRNS) zu Messenger-RNS (mRNS) statt (Abelson 1979; Scherrer et al. 1979). Die einzelnen Transcripts werden mit Hilfe der DNS-abhängigen RNS-Polymerase in HnRNS transskribiert, welche mit einer Reihe von nukleären Proteinen Komplexe bildet (sog. HnRNP) (Heinrich et al. 1978; Stevenin und Jakob 1979). Während etwa 95% der HnRNS im Nukleolus verbleiben und dort wieder abgebaut werden, unterliegen ca. 1-10% der HnRNS (als primärer Prä-mRNS) einem Transformationsprozeß aus Addition von Poly(A) an das 3'-Ende, Entfernung intervenierender, nicht-codierender Sequenzen (RNS-Splicing), "Capping" des 5'-Endes und Methylierung, um als nunmehr funktionsfähige mRNS ins Zytoplasma transportiert zu werden (Abelson 1979; Brawerman 1974; Darnell 1976; Perry 1976;

Scherrer et al. 1979). Im Rahmen dieser Transformationsprozesse konnte bisher kein Hinweis gefunden werden, der für eine Neukombination genetischen Materials bei der Entwicklung der mRNS spräche; vielmehr erscheint das Prinzip der Kolinearität gewahrt, sodaß die funktionsfähigen codierenden Sequenzen der mRNS in gleicher Abfolge vorliegen, wie die primäre Matrize (Lewin 1980; Scherrer et al. 1979).

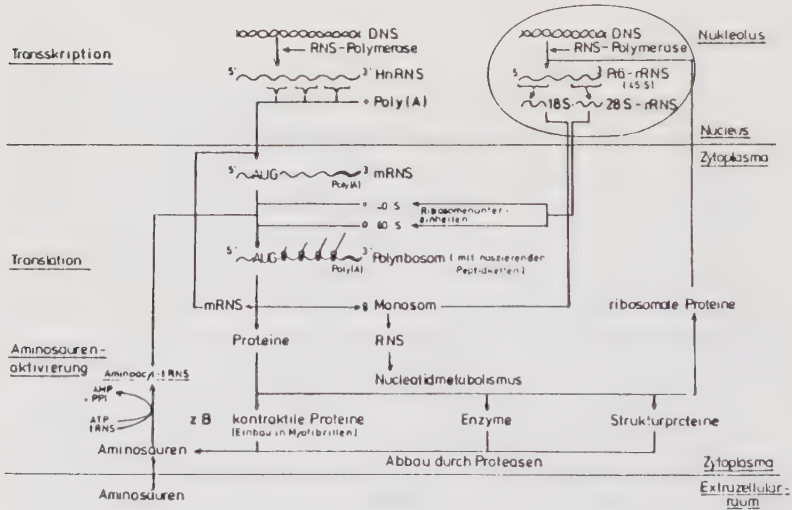


Abb. 1: Schematische Darstellung der Organisation der Genexpression in eukaryonten Zellen (Aus: Zählinger; "Die Regulation der Proteinsynthese am normalen Herzen und unter pathologischen Bedingungen" 1981)

Parallel zu diesen Vorgängen erfolgt an der im Zellkern befindlichen DNS mit Hilfe der RNS-Polymerase I die Transskription der für die ribosomale RNS (rRNS) codierenden Gene, die zunächst als sog. Prä-rRNS (Sedimentationskonstante 45S) vorliegen. Aus dieser Prä-rRNS entstehen durch enzymatische Spaltung - nach Anlagerung von im Zytoplasma synthetisierten ribosomalen Strukturproteinen und der Entfernung sog. "Spacer-RNS-Sequenzen" - die 18S und 28S rRNS, die ins Zytoplasma transportiert und dort als 40S und 60S Ribosomenuntereinheiten im Pool gespeichert werden (Chambon 1975; Perry 1976).

1.2. Translation

Im Zytoplasma der einzelnen Gewebe liegen unterschiedliche Mengen (10-80%) der aus dem Nukleolus transportierten mRNA in freier, nicht-translatierter Form vor (Civelli et al. 1980; Zähringer et al. 1976). Erst nach Anlagerung der 40S und 60S Ribosomenuntereinheiten und weiterer Initiationsfaktoren wird die Translation der mRNA in die Aminosäuresequenzen der zu synthetisierenden Proteine möglich. Die Geschwindigkeit der Translation wurde in vivo und in vitro gemessen. Sie beträgt bei 25°C 0,8 Aminosäuren pro Sekunde für die Translation von Ovalbumin-mRNA und Hämoglobin-mRNA in vitro (Lodish und Jakobsen 1972; Palmiter 1973). In intakten Zellen wurden Werte von 1-6 Aminosäuren pro Sekunde gemessen (Palmiter 1975; Scornik 1974).

Bei 10^3 - 2×10^4 verschiedenen mRNA-Molekülen reicht die in der mRNA-Population einer Zelle enthaltene Information für die Synthese ebensovieler verschiedener Proteine. Die Länge der jeweiligen mRNA, charakterisiert durch ihr Molekulargewicht bzw. durch ihre Sedimentationskonstante sowie die an sie gebundene Anzahl von Ribosomen, ist direkt proportional der Länge des zu synthetisierenden Proteins (Zähringer 1979).

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Faktoren, deren koordiniertes Zusammenwirken bei der Translation von mRNA in Protein durch Kettenstart, Elongation und Termination der Proteinsynthese erforderlich ist; hierbei kann die Translation an jedem der einzelnen Schritte durch inhibierende oder stimulierende Faktoren entscheidend beeinflusst werden (nach Zähringer 1979).

Nachdem die fertige Proteinkette synthetisiert ist, veranlassen Terminations- und Dissoziationsfaktoren die Ribosomen, sich von der mRNA zu lösen und in ihre 40S und 60S Untereinheiten zu zerfallen, während die neu synthetisierten ribosomalen Strukturproteine in den Nukleolus transportiert werden, alle übrigen (myofibrillären und mitochondrialen Proteine, Membranproteine, Enzyme etc.) an den jeweiligen Ort ihrer Funktion.

Reaktionsabschnitt	Reaktionspartner
Kettenstart (Initiation)	Formyl-methionyl-tRNA mRNA (AUG-Codon) mRNA (Ribosomenbindungsabschnitt) Ribosomenuntereinheiten (40S und 60S) Initiationsfaktoren Mg ⁺⁺ GTP
Kettenverlängerung (Elongation)	mRNA im Verbund mit Ribosomen (Polysom) und der naszierenden Peptidkette Aminoacyl-tRNA Elongationsfaktoren GTP Mg ⁺⁺ , K ⁺
Kettenabschluß (Termination)	mRNA (Terminationscodon) mit Ribosomen und fertiggestellter Proteinkette Terminationsfaktor Dissoziationsfaktor Peptidyltransferase GTP

Tabelle 1: Reaktionspartner bei der Translation von mRNA in Protein
(Modifiziert nach Zähringer 1979)

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß Proteine, die aus der Zelle sezerniert werden, im allgemeinen von membrangebundenen Polyribosomen und deren mRNA synthetisiert werden, während in der Zelle retinierte Proteine an Polyribosomen und deren mRNA translatiert werden, die in freier Form im Cytosol vorliegen (Übersicht bei Zähringer et al. 1977).

Die Mechanismen der posttranslationalen Proteinmodifikationen, die insbesondere die aus der Zelle zu sezernierenden Proteine betreffen, beispielsweise die Glycosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und Abspaltung von Peptidketten sind in Übersichtsarbeiten dargestellt, am Herzmuskel jedoch bisher noch wenig erforscht.

1.3. Mitochondriale Proteinsynthese

Gesondert betrachtet werden muß die Synthese mitochondrialer Proteine, da Mitochondrien über eine eigene doppelsträngige, zirkuläre DNS (Sanger 1981) sowie über alle für Transkription und Translation benötigten Enzymsysteme autonom verfügen.

Die mitochondriale DNS, deren Nukleotidsequenz kürzlich aufgeklärt wurde (Sanger 1981), enthält ca. 35-38 Gene, die Sequenzen der verschiedenen Spezies mitochondrialer rRNA, tRNA und mRNA codieren; wobei mitochondriale mRNA in Proteine translatiert wird, die ausschließlich innerhalb der Mitochondrien synthetisiert werden - 10-13 Proteine, vorwiegend Glycoproteine der inneren Mitochondrienmembran (Rabinowitz 1973; Sanger 1981). Hierzu gehören u.a. Untereinheiten der mitochondrialen ATPase, der Cytochrom c-Oxidase sowie Cytochrom b. Die übrigen 90% der mitochondrialen Proteine werden an zytoplasmatischen, freien Polyribosomen synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien eingeschleust (Schatz et al. 1981).

Die Vermutung einer evolutionsmäßigen Herkunft der Mitochondrien aus in die Zelle integrierten Bakterien erscheint zweifelhaft, obwohl sie sich auf die Beobachtung stützen könnte, daß deutliche Unterschiede zwischen dem genetischen Code der Mitochondrien und dem normalen genetischen Code bestehen (Sanger 1981) und daß die Organisation der mitochondrialen Proteinsynthese Parallelen zu derjenigen prokaryonten Organismen aufweist, etwa in der Größe der Ribosomen (60S), der Inhibierbarkeit durch Chloramphenicol und der fehlenden Inhibierbarkeit durch Cycloheximid.

Jedoch besitzt die mitochondriale mRNA ähnlich der mRNA eukaryonten Zellen ein Poly(A)-Segment von 50-80 Nukleotiden (Perlman et al. 1973), während mRNA aus prokaryonten Zellen generell keine Poly(A)-Sequenz besitzt (Perry 1976).

2. Organspezifische Besonderheiten von Genexpression und Proteinsynthese im Myokard

2.1. Allgemeines

Alle bislang vorliegenden Arbeiten lassen darauf schließen, daß die generellen Mechanismen der Genexpression und Proteinsynthese verschiedener eukaryonten Zellen untereinander nur geringfügige Unterschiede aufweisen, die sich aus den differenten Funktionen der einzelnen Zellverbände ableiten lassen.

Während manche Organe, wie etwa die Leber sowie exokrine und endokrine Organe, vorwiegend aus der Zelle zu sezernierende Proteine neusynthetisieren, werden die im Herzen gebildeten Proteine in der Zelle retiniert. Frühere Untersuchungen über eine unterschiedliche Organisationsform der Proteine in Zellen differenter Funktion zeigten, daß sezernierte Proteine von membrangebundenen Polyribosomen synthetisiert werden, retinierte Proteine jedoch von frei im Zytoplasma liegenden Polyribosomen (Übersicht bei Zähringer et al. 1977). So liegen im Herzmuskel, einem Organ, in dem nur retinierte Proteine synthetisiert werden, die im wesentlichen der Strukturhaltung dienen, mRNA und Polyribosomen zu etwa 90% in nicht-membrangebundener, freier Form vor; in der Leber, deren Zellen vorwiegend Proteine sezernieren, sind dagegen 71-88% der Polyribosomen und mRNA in membrangebundener Form vorhanden (Zähringer 1979 und 1981; Zähringer und Kandolf 1980). Darüberhinaus unterscheiden sich Leber und Herzmuskel auch deutlich in der Höhe des DNS- und RNS-Gehaltes, der im Myokard deutlich niedriger ist, als in der Leber, deren Proteinsynthese neben der Strukturhaltung vor allem der Synthese großer Mengen sezernierter Proteine dient (Zähringer 1979).

60-70% der im Herzmuskel vorhandenen Zellen sind Bindegewebszellen, 30-40% Myozyten, die jedoch 70-80% des myokardialen Volumens repräsentieren (Sandritter 1977). Das zelluläre Volumen der Myozyten teilt sich

auf in etwa 50% Myofibrillen, 30% Mitochondrien, 10% Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums, 8% Glykogen, Golgiapparat etc. und etwa 2% Zellkerne (Anversa et al. 1980).

Herzmuskelzellen teilen sich im Erwachsenenmyokard nicht mehr (Morgan et al. 1974), da die myokardiale DNS-Synthese und die mitotische Aktivität der Myozyten postnatal kontinuierlich abnimmt, um nach 3-4 Wochen fast völlig zu sistieren (Zak und Rabinowitz 1979), wogegen mit zunehmendem Alter eine steigende Polyploidisierung nachzuweisen ist (Adler und Sandritter 1980). Die myokardialen Hauptproteine, kontraktile Proteine, Strukturproteine und Cytochrome, unterliegen Halbwertszeiten von 5-12 Tagen (Zähringer 1979) und befinden sich im normalen Herzmuskel in einem steady-state, sodaß Wachstumsprozesse wie auch Reparationsvorgänge an geschädigten Myozyten nur durch ein Überwiegen der Neusynthese über den Abbau myokardialer Proteine möglich werden.

2.2. Intrazelluläre Organisation der myokardialen Proteinsynthese

Die Beobachtung, daß sezernierte Proteine von membrangebundenen Polyribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert werden, in der Zelle retinierte Proteine dagegen von frei im Zytoplasma liegenden Polyribosomen, führte zu der Annahme einer wesentlichen Bedeutung der intrazellulären Architektur bei der Regulation der Proteinsynthese in eukaryonten Zellen. Dieses Konzept wurde weiter bestätigt durch den Nachweis einer charakteristischen Verteilung der mRNA zwischen der mikrosomalen Fraktion - also der aus dem endoplasmatischen Retikulum bzw. aus Membransystemen, denen Polyribosomen angeheftet sind, stammenden - und der postmikrosomalen Fraktion von Gewebshomogenaten.

10-80% der gesamten zytoplasmären mRNA sind in der postmikrosomalen Fraktion vom Homogenat verschiedener Gewebe in einer nicht-translatierten Form enthalten. Im Myokard beträgt dieser Anteil der mRNA im postmikrosomalen Überstand 16% (Zähringer 1981). Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, daß im normalen Herzmuskel nur die Mikrosomen und die in ihnen enthaltenen Polyribosomen und mRNA eine wichtige Rolle bei der Synthese myofibrillärer Proteine spielen (Zähringer 1981), da Zellkerne, Myofibrillen und Mitochondrien nur relativ geringe Mengen an Gesamt-RNS, mRNA und Polyribosomen enthalten. Somit wurde die Hypothese,

myofibrilläre Proteine würden durch einen speziellen Polyribosomenpool der Myofibrillen selbst synthetisiert (Narayanan 1973), widerlegt. Der Pool nicht-translatierter mRNA, der im myokardialen postmikrosomalen Überstand nachgewiesen werden konnte, enthält neben degradierter mRNA als Abbauprodukt jedoch auch intakte, funktionsfähige mRNA, die möglicherweise die Funktion eines Reserve-Pools erfüllt, um in Zuständen erhöhten myokardialen Proteinbedarfes eine rasche Steigerung der Proteinsyntheserate zu gewährleisten (Zähringer 1981).

3. Isolierung und Charakterisierung myokardialer Polyribosomen

Das Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Genexpression und Proteinsynthese wurde in den letzten beiden Jahrzehnten durch die Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Isolierung, Charakterisierung und zellfreien Translation von Polyribosomen und mRNA aus den verschiedensten Organen bedeutend erweitert.

Dabei war es jedoch aufgrund der speziellen, durch die Anordnung der Myofibrillen bedingten rigiden Struktur des Myokards nicht möglich, die bisher benutzten Methoden ohne quantitative und qualitative Einbußen auf den Herzmuskel zu übertragen.

Erst Zähringer et al. beschrieben 1980 standardisierte Methoden der Isolierung strukturell intakter myokardialer Polyribosomen und mRNA und ihrer Quantifizierung und Charakterisierung. Der extrahierbare Gehalt an myokardialer mRNA sowie die Ausbeute an Polyribosomen liegt hier um 50-500% höher als bei den bisher verwendeten Methoden (Meerson 1974) und die Analyse des Sedimentationsverhaltens der isolierten Gesamt-RNS, mRNA und Polyribosomen auf Sucrose-Gradienten demonstriert deren strukturelle Integrität (Zähringer et al. 1980). Durch Hybridisierung myokardialer mRNA, die an ihrem 3'-Ende eine Sequenz aus Poly(A)-Nukleotiden enthält, an (³H)-markiertes Poly(U) konnte die myokardiale mRNA nicht nur hinsichtlich der Länge ihrer Poly(A)-Sequenz näher charakterisiert werden; sondern es läßt sich auch der tatsächliche myokardiale mRNA-Gehalt durch Hybridisierung genauer quantifizieren, als dies selbst durch die neuen Methoden der mRNA-Isolierung möglich ist (Zähringer 1981). Die erhaltenen Werte für die myokardiale mRNA liegen bei einem Poly(A)-Gehalt von 4,3% mit einer Sequenzlänge von ca. 88 Nukleotiden.

Der zuverlässige Nachweis von myokardialer mRNS durch Hybridisierung an (^3H)-Poly(U) ist in einer Größenordnung von etwa 25ng mRNS in Proben unbekannten mRNS-Gehaltes möglich (Zähringer 1981). Der Beweis einer erhaltenen funktionellen Integrität isolierter Polyribosomen und mRNS erfolgt über ihre zellfreie Translation und die Identifizierung in vitro synthetisierter, kompletter Proteine, für die die jeweiligen Polyribosomen oder mRNS-Präparationen codieren. Als zellfreie Systeme wurden das mRNS-abhängige Retikulozyten-Lysat-System und das Weizenkeim-System verwendet; eine Identifizierung der zellfrei synthetisierten Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese und Fluorographie der Gele. Die ausführlich beschriebenen Methoden (Zähringer et al. 1981) zeigten, daß die myokardialen Polyribosomen zellfrei in die wichtigsten myokardialen Proteine (Aktin, Myosin, Troponin, Tropomyosin sowie Myoglobin) translatiert werden können und außerdem noch für die Synthese einer Anzahl weiterer myokardialer Proteine codieren, deren Identität bisher noch nicht geklärt wurde. Gleichzeitig konnte der myokardiale Gehalt an verschiedenen, spezifischen mRNS-Spezies (Myosin-mRNS, Aktin-mRNS etc. bestimmt werden (Zähringer 1981).

4. Biochemische Veränderungen im hypertrophierenden Herzmuskel sowie bei Herzmuskelhypertrophie-Regression

Neben den vielfältigen Faktoren, die die Proteinsynthese im normalen Herzmuskel entscheidend verändern können - als Beispiel seien hier nur die Einflußgrößen Alter, Ernährungszustand und hormonale Faktoren erwähnt, über deren Auswirkungen auf die myokardiale Proteinsynthese in der Literatur eine Vielzahl detaillierter Untersuchungen vorliegen - ist es insbesondere von Interesse, die Regulation der Proteinsynthese im Herzmuskel unter pathologischen Bedingungen zu studieren.

Neben den Auswirkungen von Medikamenten und Noxen (Gibson und Harris 1973), den Veränderungen unter Herzmuskelschämie (Kleitke 1973; Jefferson 1971) und Atrophie (Hjalmarson 1975; Sanford 1978; Cutilletta 1980; Zähringer 1982), sowie dem Zusammenhang mit Kardiomyopathien diverser Genese, insbesondere der Adriamycin-Kardiomyopathie (Zähringer und Höfling 1980), ist auch der Adaptationsmechanismus der Herzmuskelhypertrophie eng gekoppelt mit eingreifenden Veränderungen in die Regulation der myokardialen Proteinsynthese.

4.1. Herzmuskelhypertrophie

Die enorme Adaptationsfähigkeit des Herzmuskels an veränderte Gegebenheiten, seien es Umweltbedingungen (starkes körperliches Training, Höhengaufenthalt etc.) oder pathologische Belastungen innerhalb des Organismus (Hypertonie, Vitien, pulmonale Erkrankungen etc.) ist in ihren morphologischen, hämodynamischen und klinischen Auswirkungen in vielen Studien dokumentiert (vgl. Hört 1980; Riecker 1982).

Die Regulationsfähigkeit der myokardialen Proteinsynthese, die im Rahmen dieser Adaptationsvorgänge eine entscheidende Rolle spielt und die ihr zugrunde liegenden biochemischen Veränderungen wurden am Beispiel der experimentellen Herzmuskelhypertrophie nach Koarktation der Aorta analysiert, die eine gesteigerte Arbeitsbelastung des Myokards induziert und innerhalb kurzer Zeit das Resultat einer adaptiven Hypertrophie der Myozyten zeigt (Übersichten bei Meerson 1975; Rabinowitz und Zak 1972 und 1975).

Tabelle 2 zeigt die zeitliche Abfolge dieser Veränderungen und ihr quantitatives Ausmaß. Deutlich erkennbar ist die entscheidende Bedeutung, die der Stimulation der RNS- und Proteinsynthese zukommt, während Veränderungen des Abbaues myokardialer Proteine, die theoretisch das Entstehen der Herzmuskelhypertrophie ebenfalls erklären könnten, offenbar von weitaus geringerer Bedeutung sind (Gudbjarson 1964; Rabinowitz und Zak 1972).

Zu den frühesten biochemischen Veränderungen im hypertrophierenden Herzmuskel zählen die Aktivitätssteigerung der Ornithin-decarboxylase sowie die Zunahme der Polyaminsynthese (Matsushita et al. 1972; Caldarera et al. 1971, 1974). Der stimulierende Einfluß der Polyamine auf Transkription und Translation ist seit längerem bekannt. Raina und Janne haben 1975 in einer Übersichtsarbeit auf den entscheidenden Einfluß der Polyamine Spermin, Spermidin und ihrer Vorstufe Putrescin auf RNS- und Proteinsynthese in verschiedenen Organen hingewiesen. Am perfundierten Rattenherzen stimulierten alle drei Polyamine den Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in myokardiales Gesamtprotein in der Größenordnung von 250% (Gibbson und Harris 1976). Diese beobachtete Inkorporationszunahme wird von den Autoren durch die Annahme eines gesteigerten transmembranären Aminosäuretransportes erklärt, da Spermin die Aufnahme von alpha-Amino-

sobutytrat in die Myokardzelle fördere. Die Steigerung der Inkorporation sowohl von Nukleotiden in RNS und DNS als auch von Aminosäuren in kontraktile Proteine als Ausdruck der gesteigerten RNS- und Proteinsynthese (Beginn etwa 4h nach experimenteller Koarktation der Aorta; Maximum nach 3-7 Tagen; Tabelle 2) kann als Folge der bereits nach 2-4h stark erhöhten Polyaminsynthese angesehen werden.

Die nach 3-5 Tagen beobachtete Steigerung der DNS-Synthese (Meerson 1975) wird als Ausdruck einer Bindegewebsproliferation aufgefaßt, da nach allgemein akzeptierter Anschauung Erwachsenenherzmuskelzellen nicht mehr teilungsfähig sind.

Die bereits in früheren Studien (Zak 1979; Sanford 1978) beobachtete entscheidende Bedeutung der Stimulation der myokardialen Proteinsynthese für die Entwicklung einer Herzmuskelhypertrophie wurde von Zähringer et al. 1984 eingehend am Beispiel der T_3 -induzierten Herzmuskelhypertrophie bei der Ratte sowie erstmals in Herzmuskelbiopsien - von Patienten mit Mitralklappenkrankheiten - untersucht. Als ein die Proteinsyntheserate entscheidend beeinflussender Faktor könnte ein gesteigerter mRNS-Gehalt als direkter Ausdruck einer Stimulation der myokardialen Genexpression durch Thyreoidhormone seinerseits eine direkte Zunahme der myokardialen Proteinsynthese bewirken. Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten Zähringer et al. 1984 detailliert mögliche Veränderungen sowohl im Gesamt-mRNS-Gehalt des Gewebes als auch in der intrazellulären Verteilung der myokardialen mRNS sowie ihrer Proteinsynthese-Aktivität im zellfreien System.

Es ergaben sich sowohl im Modell der T_3 -induzierten Herzmuskelhypertrophie als auch bei den Biopsien aus hypertrophierten Herzen von Patienten mit Mitralklappenkrankheiten (Klappeninsuffizienz bzw. -stenose) deutlich erhöhte Werte (30-50%) des myokardialen mRNS-Gehaltes, die auf eine Aktivierung transkriptionaler oder post-transkriptionaler Prozesse der myokardialen Genexpression hindeuten. Die Autoren berichten weiter über eine generelle und offenbar unspezifische Stimulation der Gene, die für die überwiegende Mehrzahl der myokardialen mRNS-Spezies codieren und damit eine unspezifische Steigerung der myokardialen Proteinsyntheserate einleiten. Spezielle Untersuchungen der myokardialen Myosin-Isoenzyme hatten bereits früher gezeigt, daß auch die distinkte, spezifische Zunahme einiger weniger kontraktiler Proteine bzw. eine Verschiebung in der Relation der MHC-Isoenzyme bei der Proteinneusynthese während Herzmuskelhypertrophie zu beobachten ist (Mercadier 1981).

Stunden nach Beginn der Druckbelastung	Biochemische Veränderung	% Steigerung	Dadurch ausgelöste Veränderung
2-4 (+2, Peak 5-10 Tage)	Ornithin-Decarboxylase	bis 200	Polyaminsynthese
2(Peak 2-7 Tage)	Polyaminsynthese	80-120	Proteinsynthese
2-3	Polyribosomenspiegel (elektronenmikroskopisch)		Proteinsynthese
4 (Peak 2-3 Tage)	Nukleotidinkorporation in rNS und tNS	300-1000	rNS-/tNS-Synthese
4-8 (Peak 3-7 Tage)	Gesamt-rNS	25-30	Proteinsynthese
3-24 (Peak 3-5 Tage)	Aminosäureinkorporation in kontraktile Proteine	50-100	Proteinsynthese
12-72	rNS-Polymerase	40-400	rNS-Synthese
24	Uridinkinase	60	Nukleotidsynthese
24-72	Adeninnukleotidsynthese	250	rNS-Synthese
24-48	tNS-Gehalt	100	Proteinsynthese
24-72	mNS-Gehalt	30-50	Proteinsynthese
24-48	Synthese von Cytochrom c und Kollagen	12-22	Mitochondrienzahl Bindegewebszahl
48	Quotient: Trans- latierende/nicht-trans- latierende Ribosomen	50	Proteinsynthese
48	Einbau von Prolin in Kollagen	400-600	Kollagenspiegel
48-168	Mitochondriale DNS- Konzentration	11-117	Mitochondrienzahl
72 (evtl. früher)	Transport von Amino- säuren in die Zelle	0-40	Proteinsynthese
72-120	DNS-Synthese		Bindegewebszahl

Tabelle 2: Biochemische Veränderungen im hypertrophierenden Herzmuskel (Modifiziert nach Zähringer 1979)

Neben der generellen Stimulation der myokardialen mRNA und damit der myokardialen Proteinsynthese unterstreicht auch diese Beobachtung einer spezifischen Zunahme bestimmter myokardialer mRNA-Spezies unter dem Einfluß Herzmuskelhypertrophie-induzierender Faktoren die Bedeutung, die dem myokardialen mRNA-Gehalt für die Proteinsynthese-Kapazität des Herzmuskels bei der Adaptation an veränderte Leistungsbedingungen zukommt.

Eine der Grundfragen bei der Problematik der Herzmuskelhypertrophie-Entstehung bleibt neben dem Verständnis der einzelnen biochemischen Mechanismen und ihrer Regulation die Suche nach dem primären Stimulus, der die Änderung der myokardialen Genexpression bewirkt und damit die gesteigerte Proteinsynthese im Herzmuskel und letztlich die Entstehung der Herzmuskelhypertrophie initiiert.

Meerson und Pomoinitzky (1972) postulierten als primär wirksamen Mechanismus bei der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie einen initialen Abfall der energiereichen Substanzen, vor allem des ATP. Andere Autoren dagegen konnten diesbezüglich keine oder nur geringfügige Abnahmen der energiereichen Phosphate beobachten (Schreiber et al. 1971). Gegen die Hypothese, eine initiale ATP-Verminderung sei von ursächlicher Bedeutung für die mit der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie einhergehende Stimulation der myokardialen Proteinsynthese, sprechen auch die Untersuchungen von Zimmer et al. (1980). Hier wurde am Modell der Isoproterenol-induzierten Herzmuskelhypertrophie gezeigt, daß auch dann eine für die beginnende Hypertrophie typische Stimulation der Proteinsynthese eintritt, wenn der myokardiale ATP-Gehalt durch kontinuierliche Infusion von Ribose konstant gehalten wird.

Gibson und Harris (1972) untersuchten die Rolle von möglichen Veränderungen der Acetylierungsrate von Aminosäuren bei der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie und zeigten, daß bei der Arbeitshypertrophie des Herzmuskels keine Änderung der Phenylalanin-tRNA-Synthetase und der Aminoacyl-tRNA-Transferase auftreten, wie dies von Goldberg (1971) anhand seiner Untersuchungen bei *Escherichia coli* auch für eukaryonte Organismen vermutet worden war.

Eine weitere Hypothese über Mechanismen, die die myokardiale Proteinsynthese initial stimulieren, schreibt der Dehnung ("stretch") der Herzmuskelzellen bei erhöhtem preload oder afterload eine bedeutsame Rolle

zu, da die durch Dehnung veränderte Beschaffenheit der Zellmembran den transmembranären Transport von Protein und RNS-Präkursoren erleichtere und die Inkorporation von alpha-Aminosobutyrate in den Papillarmuskel steigere (Lesch 1970). Diese Beobachtungen werden gestützt durch Untersuchungen von Morgan (1971) und Franze-Fernandez (1971), die am isoliert perfundierten Herzen als Folge erhöhten Substratangebotes an intrazellulären Aminosäuren einen Anstieg der myokardialen Proteinsyntheserate verzeichneten und als möglichen Mechanismus der Stimulation die Aktivierung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase im Nukleolus durch erhöhte intrazelluläre Aminosäurespiegel postulierten (Übersicht bei Rabinowitz 1973). Hammond et al. (1979) teilen Beobachtungen mit, die auf die Existenz extrahierbarer Substanzen in Herz und Niere hinweisen, die am normal perfundierten Herzen die "Translationskapazität" isolierbarer RNS stimulierten. Neben der sekundären Induktion der Herzmuskelhypertrophie durch hypertensive, hämodynamische Einflüsse, die über Blutdruckerhöhung eine Steigerung der linksventrikulären afterload bewirken, muß diese Möglichkeit einer direkten Stimulation der myokardialen Proteinsynthese durch humorale Faktoren ("pressor substances") in Betracht gezogen werden. Verschiedene dieser bekannten pressor substances (adrenerge Stimuli, Angiotensin II) haben selbst ohne gleichzeitigen Anstieg des arteriellen Blutdruckes eine Zunahme der myokardialen Proteinsynthese und des Herzgewichtes bewirkt. So konnte eine Steigerung der Proteinsyntheserate in Myozyten-Zellkulturen allein durch die Zugabe von Angiotensin II bewirkt werden und auch die Infusion von Katecholaminen in nicht-Blutdruck-relevanter Dosierung, also ohne hämodynamische Auswirkungen, initiierte eine deutliche Zunahme der myokardialen Proteinsynthese sowie die Entwicklung einer ventrikulären Hypertrophie mit den Zeichen vermehrter Kollagenablagerung und Myokardfibrose (Gordon 1972; Szakacs 1960). Von Interesse erscheint in dieser Hinsicht die Beobachtung von Suzuki (1975), daß nach Adrenalectomie die Entwicklung der Herzmuskelhypertrophie sowie der Anstieg der myokardialen RNS-Konzentration nach Aortenkonstriktion ausbleiben und die Versuchstiere rasch versterben. Auf die Bedeutung adrenerger Faktoren bei der Entstehung, aber auch der Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie und ihre Beeinflussung der Proteinsynthese im Myokard soll im folgenden Kapitel noch näher eingegangen werden.

2. Herzmuskelhypertrophie-Regression

Die wichtigste Ursache für die Entstehung der Herzmuskelhypertrophie ist die arterielle Hypertonie, die über eine erhöhte afterload und damit vermehrte Druckbelastung des linken Ventrikels das adaptive Wachstum der Myozyten stimuliert. Somit liegt es nahe, die Erwartungen einer therapeutischen Herzmuskelhypertrophie-Regression primär an die effektive Senkung des Blutdruckes zu knüpfen. Die Arbeiten von White (1945) zeigten erstmals die Möglichkeit einer therapeutischen Hypertrophie-Regression als Folge einer Blutdrucksenkung nach Sympathektomie. Daß jedoch nicht in allen Fällen eine direkte Kausalität zwischen der Entwicklung und Rückbildung einer Herzmuskelhypertrophie und der jeweiligen Blutdruckhöhe besteht, zeigte sich in den folgenden Untersuchungen rasch: Trotz einer effektiven Blutdrucksenkung durch Hydralazin konnte keine Regression der Herzmuskelhypertrophie verzeichnet werden (Masson 1958), gelegentlich kommt es - wie bei Minoxidil-Gabe - trotz ausgeprägter Blutdrucksenkung sogar zur Zunahme der Herzmuskelmasse (Rushkoaho 1984), andererseits kann es unter alpha-Methyldopa-Therapie trotz fehlender Beeinflussung des Blutdruckes zu einer deutlichen Senkung des Herzgewichtes als Ausdruck der Herzmuskelhypertrophie-Regression kommen (Sen et al. 1977).

Der divergierende Einfluß der verschiedenen Gruppen von Pharmaka auf Blutdruck und Herzmuskelhypertrophie-Regression läßt sich wie folgt zusammenfassen:

Während Calciumantagonisten (Strauer 1983; Kazda 1982) und ACE-Hemmer (Lederle 1984; Nakashima 1984) neben einer deutlichen Blutdrucksenkung zu ausgeprägter Herzmuskelhypertrophie-Regression führen, differieren die bei β -Blocker-Therapie erhobenen Befunde klinischer und tierexperimenteller Studien, ohne daß diese Unterschiede bisher ausreichend interpretiert werden können.

Ibrahim (1981) und Kaul (1984) wiesen in klinischen Untersuchungen zum Teil ausgeprägte Herzmuskelhypertrophie-Regression unter β -Blocker-Therapie nach, während tierexperimentelle Arbeiten trotz guter Blutdruckeinstellung keine signifikante Abnahme der Herzmuskelmasse demonstrieren konnten (Strauer 1984; Lundin 1984; Sen 1983).

Alpha-Methyldopa, das nur in einigen Fällen zu einer Blutdrucksenkung

führte, bewirkte jedoch in fast allen Untersuchungen einen deutlichen Rückgang der Herzmuskelhypertrophie (Tomanek 1979; Lundin 1984; Sen 1983; Fuad 1982; Limas 1980; Kuwajima 1982).

Pharmaka dagegen, die über Vasodilatation die Nachlast senken, wie etwa Hydralazin (Sen 1983; Limas 1980), Prazosin (Rushkoaho 1984) Und Minoxidil (Sen 1983; Rushkoaho 1984) führen ebenso wie Diuretika (Idiko 1983; Wollam 1983) zu oft stark ausgeprägter Blutdrucksenkung, ohne signifikant Einfluß auf die Herzmuskelmasse zu nehmen (siehe Tabelle 3a,b).

HERZMUSKELHYPERTROPHIE - REGRESSION: TIEREXPERIMENTELLE DATEN (1)

Substanz	RR - Reduktion	Abnahme der Herzmuskelmasse	Autor
α -Methyldopa	6 %	15 %	Tomanek et al. 1979
"	3 %	3 %	Lundin/Hallback 1983
"	29 %	20 %	Sen 1983
"	39 %	24 %	Limas/Spier 1980
"	19 %	15 %	Kuwajima et al. 1982
Urapidil	18 %	3 %	Kobrin et al. 1984
Prazosin	10 %	6 %	Ruskoaho 1984
Diuretika	8-29 %	0-19 %	Sharma et al. 1983
"	3 %	14 %	Idikio et al. 1983
Minoxidil	18 %	+3 %/+11 %	Ruskoaho 1984
"	40 %	+9 %	Sen 1983
ISDN	8 %	5 %	Ruskoaho 1984
Unclipping (resulter Hochdruck)	30 %	17 %	Kuwajima et al. 1982

Tabelle 3a: Daten tierexperimenteller Studien über therapeutisch induzierte Herzmuskelhypertrophie-Regression: Einfluß verschiedener Pharmaka auf Blutdruck und Herzmuskelmasse (nach Zähringer 1985)

HERZMUSKELHYPERTROPHIE - REGRESSION: KLINISCHE DATEN

Substanz	RR - Reduktion	Abnahme der Herzmuskelmasse	Autor	
Ca ⁺⁺ -Antagonist: Nifedipin	11 %	15 %	Strauer	1983
ACE - Hemmer: Captopril	29 %	+	Lederle et al.	1983
"	+	11 %	Devereux et al.	1980
Enalapril	16 %	12 %	Nakashima/Tarazi	1984
"	18 %	30 %	Dunn et al.	1984
"	+	12 %	Fouad et al.	1983
β - Blocker: Atenolol	19 %	11 %	Ibrahim et al.	1981
Labetalol	23 %	33 %	Kaul et al.	1984
α - Methyl dopa	19 %	22 %	Wollam et al.	1983
"	0 %	17-35 %	Fouad et al.	1982
Diuretika (Hydrochlorothiazid)	21 %	3 %	Wollam et al.	1983
"Antihypertensive Behandlung"	13 %	17 %	Schlant et al.	1982
"	19 %	21 %	Sonotani et al.	1981

Tabelle 3b: Daten klinischer Studien über therapeutisch induzierte Herzmuskelhypertrophie-Regression (nach Zähringer 1985)

Analog zu dieser beobachteten Dissoziation zwischen therapeutisch beeinflussbarer Blutdruckhöhe und dem jeweiligen Ausmaß der Herzmuskelhypertrophie-Regression sprechen Befunde der Arbeitsgruppe von Fouad und Tarazi (1983) dafür, daß zwischen Blutdruckgröße und Herzmuskelhypertrophie, die echokardiographisch anhand der Septumdicke dokumentierbar ist, innerhalb eines Patientenkollektives nur schwache Korrelation besteht. Nach anderen Beobachtungen führt erst eine Blutdrucksenkung von mehr als 10% zur Regression einer bestehenden Herzmuskelhypertrophie, die wiederum selbst als Einflußgröße auf das Ausmaß der Reduktion des

Herzgewichtes angesehen werden muß: Patienten, deren Herzmuskelhypertrophie vor Beginn der Therapie am ausgeprägtesten war, zeigten auch die prozentual größte Abnahme der Herzmuskelmasse (Drayer 1983).

Im folgenden werden zunächst die wichtigsten biochemischen Veränderungen bei der Herzmuskelhypertrophie-Regression, bezugnehmend auf das jeweilige experimentelle Modell, in einer kurzen Synopsis dargelegt und die Faktoren näher analysiert, die bei der Rückbildung einer Herzmuskelhypertrophie von Bedeutung sind.

Eine Übersicht über die wichtigsten bisher untersuchten biochemischen Veränderungen bei Herzmuskelhypertrophie-Regression zeigt Tabelle 4a,b (Zähringer 1985).

HERZMUSKELHYPERTROPHIE - REGRESSION; BIOCHEMISCHE BEFUNDE (TIEREXP.) (1)

Parameter	Veränderung	Autor	
Polyamingehalt	-30 %	Perin et al.	1983
Diaminoxidase	-57 %	Perin et al.	1983
DNS - Konz.	0/+27 %	Limas/Spier	1980
	-13 %	Zähringer et al.	1982/85
	-10 %	Sen et al.	1977
RNS - Konz.	+7/+14 %	Limas/Spier	1980
	-9 %	Zähringer et al.	1982/85
	-5 %	Sen et al.	1977
Protein - Konz.	±0 %	Sen/Bumpus	1979
	±0 %	Zähringer et al.	1982/85
	±0 %	Hickson et al.	1983
	+6 %	Perin et al.	1983
Proteinsynthese	-32 %	Sanford et al.	1978
Proteindegradation	-12 %	Sanford et al.	1978
mRNS - Konz.	-21 %	Zähringer et al.	1985

Tabelle 4a: Biochemische Befunde bei Herzmuskelhypertrophie-Regression (Übersichtsarbeit von Zähringer 1985)

Parameter	Veränderung	Autor	
Catecholaminkonz.	-63 %	Sen	1983
B - Rezeptorenkonz.	+29 % (-30 %)	Ayobe/Tarazi Atkins et al.	1984 1983
Ca ⁺⁺ - Aufnahme in SR	+30 %	Limas/Spier	1980
Myosin - ATPase	+30 %	Carey et al.	1978
Myosin - Isoenzyme (Mensch)	±0 %	Wiegand et al.	1982
Myosin - Leichtketten - Sequenz	=	Klotz et al.	1982
Citratsynthese	±0 %	Hickson et al.	1983
Hydroxyprolinkonz.	+25 % +10 % -16 %	Limas /Spier Hickson et al. Motz et al.	1980 1985 1985
Kollagenkonz.	0/+8 %	Sen/Bumpus	1979
Kollagensynthese	-39 %/-53 %	Sen/Bumpus	1979

Tabelle 4b: Biochemische Befunde bei Herzmuskelhypertrophie-Regression
(Übersichtsarbeit von Zähringer 1985)

Die Autoren berichten übereinstimmend über eine verminderte Neusynthese zellulärer Strukturen, insbesondere über einen ausgeprägten Rückgang der myokardialen Proteinsyntheserate (Sanford 1978). Diese Abnahme der Syntheseleistung spielt die entscheidende Rolle bei der Verminderung der Herzmuskelmasse, während die Rate der myokardialen Proteindegradation, die ebenfalls leicht zurückgeht, bei der Regression ebenso wie bei der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie nicht von Bedeutung ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß die Regression der Herzmuskelhypertrophie bei der spontan hypertensiven Ratte nach β -Blocker-Therapie einen nahezu gleich starken Rückgang der myokar-

dialen Proteinsynthese zeigt, wie die Regression der T_3 -induzierten Herzmuskelhypertrophie nach Absetzen der die Proteinsynthese stimulierenden Thyreoidhormone. Weitere Befunde sind eine deutliche Abnahme der Polyamine, deren stimulierender Effekt auf Transskription und Translation und damit auf die myokardiale Proteinsynthese bereits oben näher erläutert wurde, sowie ihrer Vorstufe Putrescin um etwa 30% (Perin 1983).

Die Aktivität der mitochondrialen Citratsynthetase, die aufgrund ihrer Bedeutung für Glucoseabbau und Fettsäurebiosynthese als Marker des zellulären Energiebedarfs gelten kann, war bei der Regression der belastungsinduzierten Herzmuskelhypertrophie nicht meßbar (Hickson 1983); die Aktivität der Diaminoxidase und damit die Synthese biogener Amine ging bei der Regression der Isoproterenol-induzierten Herzmuskelhypertrophie drastisch zurück (Perin 1983).

Während sich die myokardialen DNS- und RNS-Konzentrationen unter den jeweiligen Untersuchungsbedingungen nur in nicht-signifikanter Weise veränderten und auch die myokardiale Proteinkonzentration bei der Herzmuskelhypertrophie-Regression unverändert blieb, zeigten sich deutliche Unterschiede in der myokardialen Hydroxyprolinkonzentration und der myokardialen Kollagensynthese (Abbildung 2).

Die durch alpha-Methyldopa eingeleitete Herzmuskelhypertrophie-Regression war mit einer deutlichen Zunahme der myokardialen Kollagenkonzentration verbunden, ebenso die nicht zur Verringerung der Herzmuskelmasse führende Gabe von Hydralazin (Limas 1980). Captopril beeinflusste die myokardiale Kollagenkonzentration nicht (Sen 1979).

Motz et al. zeigten vor kurzem (1985) in einer Studie, die in Zusammenarbeit mit den der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen entstand, daß Nifedipin-Therapie dagegen zu einer deutlichen Senkung der myokardialen Kollagenkonzentration führt.

Auf die Bedeutung von Nifedipin für die Regression der Herzmuskelhypertrophie, die in Punkt IV (Ergebnisse) noch Gegenstand ausführlicher Betrachtungen hinsichtlich der Veränderungen in der myokardialen Genexpression sein wird, soll zunächst im Rahmen dieser Übersicht nicht näher eingegangen werden.

Aus der Bedeutung sympathisch-adrenerger Stimuli für die Entstehung der Herzmuskelhypertrophie, auf die Tarazi (1982) und Östman-Smith (1981)

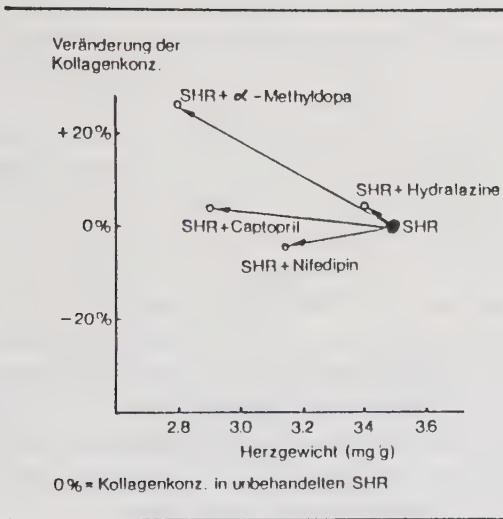


Abbildung 2: Veränderung der myokardialen Kollagenkonzentration bei medikamentös induzierter Herzmuskelhypertrophie-Regression (nach Zähringer 1985; Sen 1983; Motz et al. 1985)

bereits ausführlich hinwiesen, lassen sich auch für das Verständnis der Mechanismen der Herzmuskelhypertrophie-Regression wichtige Erkenntnisse ableiten. Sympatholytisch wirksame Antihypertensiva, wie etwa α -Methyldopa, führen zu einer drastischen Reduktion des myokardialen Katecholamingehaltes (Sen 1983) und konsekutiv zur Regression der Herzmuskelhypertrophie; Nachlast-Senker wie etwa Hydralazin bewirken über Vasodilatation zwar eine meist ausgeprägte Blutdrucksenkung, lassen jedoch den myokardialen Katecholamingehalt unbeeinflusst – sofern sie nicht sogar eine indirekte, reaktiv adrenerg-stimulierende Auswirkung haben – und initiieren damit auch keine Verminderung des Herzgewichtes.

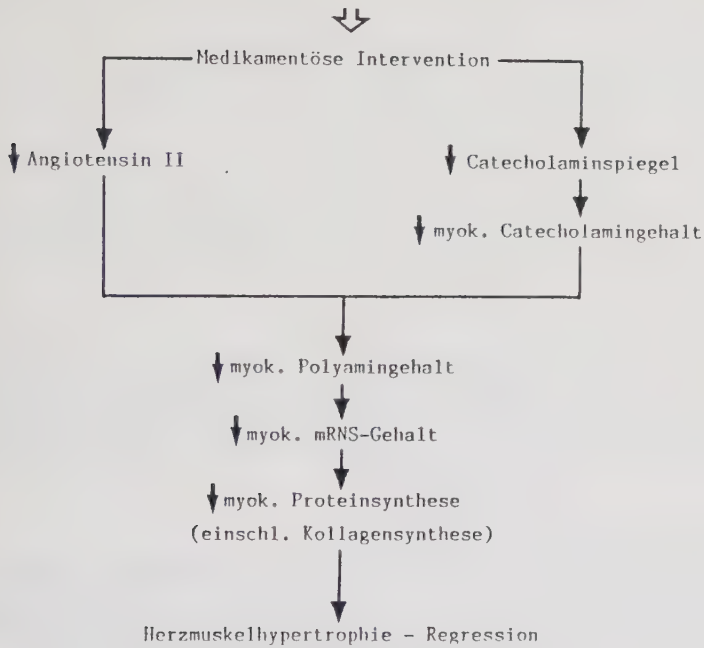
Untersuchungen von Yamori (1982) zeigten, daß β -Blocker die durch Noradrenalin-Infusionen ausgelöste Zunahme der Herzmuskelmasse weitgehend verhinderten, nicht jedoch α -Blocker, obwohl diese im Gegensatz zu den β -Blockern die Noradrenalin-bedingte Blutdrucksteigerung unterbinden konnten.

Neben diesen sympathisch-nervalen Einflüssen und der Bedeutung der Katecholamine kommt offenbar auch dem Angiotensin II eine wesentliche Rolle sowohl bei der Entstehung, als auch bei der Regression der Herzmuskelhypertrophie zu.

Angiotensin II stimuliert in myokardialen Zellkulturen die Aminosäureinkorporation und beeinflußt dadurch die myokardiale Proteinsyntheserate direkt (Kairallah 1983), während eine indirekte Beeinflussung der Proteinsynthese im Herzmuskel über die Freisetzung von Katecholaminen aus der Nebennierenrinde ebenfalls in Betracht gezogen werden muß.

In diesem Zusammenhang sind Beobachtungen interessant, wonach ACE-Hemmer, die AngiotensinII- und Reninspiegel senken, zur Regression einer Herzmuskelhypertrophie führen (Sen 1983; Tarazi 1983).

Die bisher erhobenen biochemischen Befunde wurden von Zähringer (1985) ausgehend von der Analyse der Faktoren, die bei der Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie von Bedeutung sind, in einer Reaktionskette integriert, die zu einem biochemisch begründeten Verständnis der unterschiedlichen Wirkungen verschiedener Antihypertensiva auf Blutdruckreduktion und Herzmuskelhypertrophie-Regression führt (Abbildung 3).



Hierbei: Δ DNS/RNS/Proteinkonz. = / (↓)

Δ Proteindegradation (↓)

Δ Kollagenkonz. = / (↓) / (↑)

Δ Myosin-Isoenzytmuster =

Δ Ca^{++} -Aufnahme ins SR (↑)

Δ β -Rezeptoren-Konz. (↑) / (↓)

Abbildung 3: Postulierte Reaktionskette wichtiger biochemischer Veränderungen bei Herzmuskelhypertrophie-Regression (Zähringer 1985)

II. UNTERSUCHUNGSZIELE

Zentrales Thema der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen veränderter Funktion des Herzmuskels auf die myokardiale Genexpression und Proteinsynthese darzustellen.

Hierzu dient die Isolierung und Charakterisierung der myokardialen mRNS, die aufgrund ihrer regulatorischen Funktion als wichtiger Parameter der Proteinsynthese-Aktivität im Herzmuskel angesehen werden muß und in Bezug gesetzt werden soll zu zwei unterschiedlichen Modellen myokardialer Funktionslage:

1. Die Zeitkinetik der myokardialen Proteinsynthese postmortal soll näher untersucht werden; hier vor allem auch in Hinblick auf die funktionelle Integrität der Myokardzellen post mortem in Abhängigkeit von ihrer Umgebungstemperatur.

Die wichtigsten Schritte dabei sind:

- a) Isolierung von Gesamt-RNS aus Herzmuskel zu festgelegten Zeitintervallen postmortal (0 min - 120 h), wobei aliquots in physiologischer NaCl-Lösung bei Raumtemperatur sowie bei 0°C gelagert werden.
 - b) Austestung der funktionellen Integrität der gewonnenen Gesamt-RNS in Abhängigkeit von ihrer Zeitkinetik durch in vitro-Translation und Identifizierung der neu synthetisierten Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Slabgelen durch Elektrophorese.
 - c) Quantifizierung der myokardialen Poly(A)-enthaltenden mRNS durch Hybridisierung an (^3H)-Poly(U).
 - d) Auftrennung der niedermolekularen Gesamt-RNS-Fractionen auf Formamidgelen und Identifizierung der mRNS-Sequenzlängen durch Hybridisierung an (^3H)-Poly(U).
2. Von klinisch weitaus größerer Relevanz sind jedoch die bei der Herzmuskelhypertrophie-Regression unter antihypertensiver Therapie - in dieser Arbeit unter der Gabe von Nifedipin - untersuchten Veränderungen der myokardialen Genexpression und Proteinsynthese.

Die wichtigsten biochemischen Untersuchungsschritte sind hier:

- a) Die Isolierung myokardialer Gesamt-RNS aus Herzmuskelbiopsien nach dem von Zähringer et al. (1983) modifizierten Verfahren, das selbst bei den durch Biopsien erhältlichen geringen Gewebemengen hohe Ausbeuten intakter Gesamt-RNS erzielt.
- b) Die Quantifizierung der myokardialen mRNA durch Hybridisierung an (^3H)-Poly(U).
- c) Die Bestimmung der DNS-/Gesamt-RNS-Konzentration nach Fleck und Munro (1966) sowie der Proteinkonzentration nach Lowry (1951).

Alle untersuchten Parameter der Nifedipin-therapierten spontan hypertensiven Ratten (SHR) wurden den jeweiligen Werten unbehandelter SHR sowie normotensiver Kontrolltiere gegenübergestellt.

Eine ausführliche Beschreibung dieser Materialien und Methoden folgt unter Punkt III.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Postmortale Kinetik der myokardialen Proteinsynthese

1.1. Tiermodell

Als Untersuchungsmaterial wurde der Herzmuskel männlicher Sprague-Dawley-Ratten (150 g Körpergewicht) verwendet. Die Herzen wurden sofort nach Tötung der Tiere entnommen und in physiologischer 0,9% NaCl-Lösung bei Raumtemperatur (RT) bzw. in Eis bei 0°C gelagert.

Die Zeitintervalle bis zum Beginn ihrer Aufarbeitung betrugen:

0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h.

1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad.

(^{35}S)-L-Methionin wurde von New England Nuclear, 6072 Dreieich, bezogen; die ^{14}C -markierten Standardproteine (Myosin, Albumin, Lactoglobulin, etc.) (SA 8-36 uCi/mg Protein) wurden von Amersham Radiochemical Centre,

3300 Braunschweig, gekauft; ebenso wie Retikulozyten-Lysat und Reaktionsmix zur in vitro-Translation. (^3H)-Poly(U) (SA 39 uCi/ μmol Protein) und Poly(A) $_{33}$; Poly(A) $_{95}$; Poly(A) $_{154}$; wurden von Miles Laboratories, Elkhart Indiana, bezogen (Vertrieb in Deutschland durch Miles GmbH, 6000 Frankfurt). Die Röntgenfilme für die Fluorographie (Kodak X-Omat R Film (XR-5)) wurden von Kodak, Rochester USA, gekauft (Vertrieb in Deutschland durch Fa. Weisser, 8000 München).

1.3. Isolierung intakter Gesamt-RNS aus Rattenherzen

Zur Gewinnung von Gesamt-RNS aus Herzmuskel nach der modifizierten Methode von Zähringer (1980) wurden jeweils zwei Herzen gepoolt. Die in 0,9% NaCl-Lösung gespülten Ventrikel wurden in 35 Vol. 150 mmol NaCl, 50 mmol Tris/HCl pH 8,3; 5 mmol EDTA; 1% SDS in Anwesenheit von 10,5 mg Proteinase K/lg Herzgewicht homogenisiert (2 x 10 sek. Ultra Turrax; 20000 UPM; Potter Elvehjem Homogenisator; 3 Hiebe). Nach 10 min Ruhen wurde das Homogenisat zur Phenolextraktion mit 35 ml pro lg Herzgewicht Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Gemisch (50:50:1 Vol.) versetzt, 10 min gerührt und zentrifugiert (10 min/6000 UPM/20°C/SS34 Rotor).

Die RNS-haltige wässrige Phase wurde abpipettiert, die Molarität auf 1,5 M NaAc und 50 mmol EDTA eingestellt und nach Zugabe von 1,5 Vol. Äthanol über Nacht bei -20°C präzipitiert.

Nach dem Fällen wurde die RNS pelletiert (10 min/6000 UPM/4°C/SS34 Rotor), in 2 ml 1 mmol EDTA pH 7,4 und 4 ml 4,5 M NaAc pH 5,5 gelöst und bei 4°C für 30 min präzipitiert. Erneute Pelletierung (20 min/7000 UPM/4°C/SS34 Rotor), Zugabe von 1,6 ml H_2O ; 200 μl 2 M KAc pH 5,5; 200 μl 50 mmol EDTA pH 5,5; 5 ml Äthanol und wiederum Präzipitation der RNS bei -20°C über Nacht. In einem dritten Aufarbeitungsschritt wurde das Präzipitat erneut zentrifugiert (20 min/7000 UPM/4°C/SS34 Rotor), das erhaltene Pellet 30 min vakuumgetrocknet und abschließend in 0,9 ml H_2O und 100 μl 1 mmol EDTA gelöst und aliquotiert. In dieser Form kann die myokardiale Gesamt-RNS ohne Aktivitätsverlust über Monate bei -40°C aufbewahrt werden.

Der myokardiale Gesamt-RNS-Gehalt wurde bestimmt durch Messung der optischen Dichte der 1:51 verdünnten Gesamt-RNS-Lösung bei 260 nm in einem Gillford-Spectrophotometer.

1.4. BRL-in vitro-Translation der myokardialen Gesamt-RNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat

Für die in vitro-Translation der myokardialen mRNS im zellfreien System wurde Retikulozyten-Lysat von Amersham Radiochemical Centre und (^{35}S)-Methionin von New England Nuklear verwendet; die Inkubationsbedingungen folgten den von Pelham und Jackson (1976) beschriebenen Methoden. Die Inkubation erfolgte in Aliquots von 2, 3 und 4 μg Gesamt-RNS mit je 20 μl Prämix (bestehend aus 3 μl Reaktionsgemisch, 0,7 μl H_2O , 1,3 μl KAc , 5 μl (^{35}S)-Methionin, 10 μl Rabbit-Retikulozyten-Lysat) bei 30°C im Wasserbad für 60 min.

Die Inkorporation von (^{35}S)-Methionin in Gesamtprotein wurde entsprechend der Methode von Mans und Novelli (1961) bestimmt:

1 μl des Assays wurde am Ende der Inkubation auf Whatman-Papierscheibchen (3 mm dick) aufgetragen. Die Scheibchen wurden sequentiell mit 10% TCA (10 min/ 4°C); 5% TCA (5 min/ 4°C); 5% TCA (10 min/ 93°C); 5% TCA (2x je 3 min/ 4°C) gewaschen, für ca. 2 h bei 4°C entfärbt in 10% TCA/98% Ameisensäure/30% H_2O_2 (2:1:1 Vol.), in einem Äther/Äthanol-Gemisch (1:1 Vol.) 2x je 3 min (RT) und Äther (3 min/RT) gespült und anschließend für 30 min unter einer Infrarotlampe getrocknet.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in 5 ml Toluol/PPO/POPOP in einem Packard BF 5000 Liquid Szintillationszähler.

1.5. Identifizierung der zellfrei synthetisierten Proteine

Zu 1 μl Aliquot des zellfrei synthetisierten Retikulozyteninkubates wurden 25 μl "sample buffer" (62 mmol Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% Glycerin; 5% 2-Mercapto-Äthanol) zugegeben. Nach Erhitzen (5 min/ 100°C) wurde die Probe auf einem SDS-Polyacrylamid-Slabgel analysiert. 12,5% Gele wurden als kontinuierliche Trenngele (15 x 14 x 0,1 cm slabs) verwendet und mit einem 3% Sammelgel überschichtet wie beschrieben (Maizel 1971). Die Gele wurden aus den folgenden Lösungen hergestellt:

- 1) 12,5% Trenngel: 8,87 ml H_2O ; 2,5 ml 3 M Tris-Cl pH 8,9; 0,2 ml 10% SDS; 8,32 ml Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8 Vol.);

0,1 ml 10% Ammoniumpersulfat; 0,01 ml TEMED.

- 2) 3% Sammelgel: 3,77 ml H₂O; 0,625 ml 1 M Tris-Phosphat pH 6,7;
0,05 ml 10% SDS; 0,5 ml Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)
0,05 ml 10% Ammoniumpersulfat; 0,0025 ml TEMED.

Ferner wurden 10-15% Gradientengele verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 12 mmol Tris pH 8,3; 95 mmol Glycin; 0,1% SDS. Die Elektrophorese wurde bei 180-220 V über 4-5 h durchgeführt.

Zur Orientierung über die neusynthetisierten Proteine wurden die radioaktiv markierten Standardproteine Myosin und Lactoglobulin jeweils auf den Gelen routinemäßig mit-elektrophoretisiert. Eine genaue Identifizierung der neu synthetisierten Proteine und Quantifizierung ihres Molekulargewichtes mittels Myosin-, Actin-, Albumin-, Ferritin-, Ovalbumin-, Tropomyosin-, Troponin-, Immunglobulin-, Myoglobin-, Carbonic Anhydrase-, Lactoglobulin-, Lysozym- und Cytochrom c-Standards war von Zähringer et al. bereits 1980 erarbeitet worden.

Nach Färben (1 h mit 0,2% Coomassie-Brilliant-Blue in 50% Methanol und 7% Eisessig) und Entfärben über Nacht (in 5% Methanol/7% Eisessig) (1:1) wurden die Gele zur Fluorographie vorbereitet, wie von Bonner und Laskey (1974) beschrieben. Die Filme (Kodak X-Omat R XR-5) wurden bei -80°C für 5-12 Tage exponiert, abhängig vom Ausmaß der Inkorporation von Radioaktivität im Inkubationsassay.

1.6. Hybridisierung myokardialer mRNS an (³H)-Poly(U)

Die Bestimmung des mRNS-Gehaltes von Herzmuskelgewebe erfolgte durch Hybridisierung Tritium-markierten Poly-Uridylates, (³H)-Poly(U), an die am 3'-Ende einer jeden mRNS befindliche Poly-Adenylat-Sequenz, Poly(A) (siehe Abbildung 4).

Aus der durch Szintillationszählung bestimmten Menge radioaktiver Hybride kann der Poly(A)-Gehalt des Assays und damit der mRNS-Gehalt des Gewebes errechnet werden.

Die Durchführung der Hybridisierungsassays erfolgte analog dem Vorgehen, das für die Hybridisierung anderer mRNS-Spezies beschrieben worden war (Bishop und Kaufmann 1974).

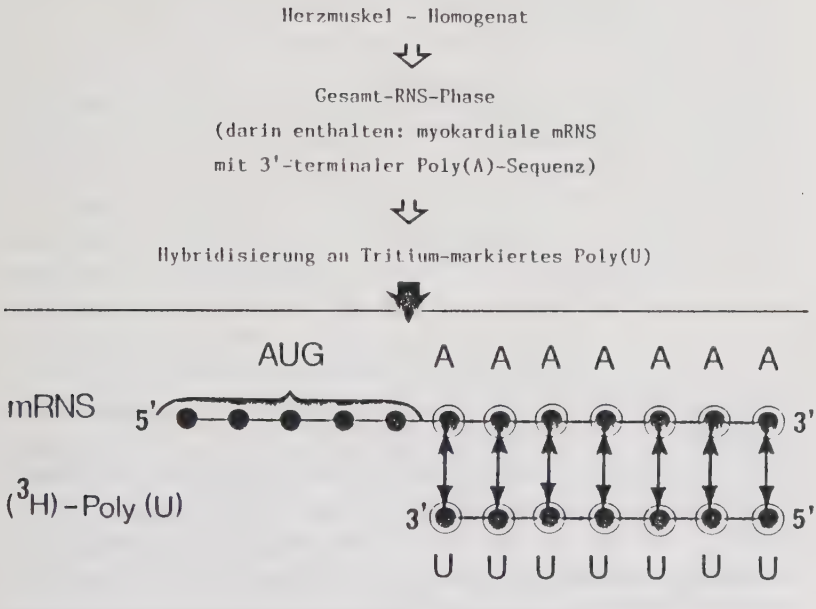


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Hybridisierungs-Assays
myokardialer mRNS an (³H)-markiertes Poly(U)

Der Inkubationsassay (192 μ l) enthielt 10 mmol Tris/HCL pH 7,0; 300 mmol NaCl; 30 mmol Na-Citrat; 747 ng (³H)Poly(U) (SA 39 uCi/ μ mol P) sowie je Probe 4,0 μ g Gesamt-RNS oder Poly(A)₉₅ in ansteigender Menge von 1-22 μ l zur Erstellung einer Standardkurve.

Die Hybridisierung (45 min/37°C) wurde durch Zugabe von 4,2 μ g Pankreas Ribonuklease A gestoppt. Routinemäßig erfolgte auch die Zugabe von 4,2 μ g Desoxyribonuklease. Nach weiterer Inkubation (30 min/30°C) wurden 200 μ g Rinderserumalbumin dazugegeben, die unverdauten, doppelsträngigen Poly(A)-(³H)Poly(U)-Hybride durch 1 ml 10% TCA (15 min/0°C) präzipitiert, auf Nitrozellulosefiltern gesammelt (0,45 μ m Porendichte) und ihre Radioaktivität in 10 ml Toluol/PPO/POPOP gezählt (Zähleffizienz 33-36%).

1.7. Auftrennung der niedermolekularen Gesamt-RNS auf Formamidgelen und Identifizierung der Poly(A)-Sequenzlänge der myokardialen mRNS durch Hybridisierung an (^3H)-Poly(U)

Die Poly(A)-Sequenzlänge nach unterschiedlicher Lagerungszeit post mortem wurde in einer Modifizierung der von Woo et al. (1975) beschriebenen Methoden durchgeführt.

250 μl myokardiale Gesamt-RNS wurden über Nacht lyophilisiert und in 30 μl 20 mmol Hepes pH 7,6; 2 mmol EDTA; 0,3 mol NaCl gelöst. Nach Zugabe von 15 Units RNase A und 5 Units RNase T_1 , um bis auf die Poly(A)-Sequenzen alle anderen RNS-Sequenzen zu verdauen, wurde bei 37°C für 60 min inkubiert. Die Auftrennung der niedermolekularen RNS-Sequenzen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (70% Formamid) auf 7% Polyacrylamid-Slabgels. Unter Modifikation bekannter Verfahren wurde für das Trenngel verwendet:

7% Acrylamid; 0,46% Bisacrylamid; 1% 5,5 Diäthylbarbitursäure; 15 mmol NaCl; 70% Formamid (das zuvor mit dem Ionenaustauscher Amberlite MB-1 gereinigt worden war); der pH 9,2 wurde mit konzentriertem TEMED erreicht.

Das Sammelgel enthielt 3% Acrylamid; 0,45% Bisacrylamid; 1% 5,5 Diäthylbarbitursäure; 70% Formamid und TEMED zur pH-Einstellung auf 9,2.

Als Elektrophoresepuffer wurde 0,018% 5,5 Diäthylnatriumbarbiturat pH 9,2 verwendet; der Probenpuffer (10–20 μl) bestand aus 10% Sucrose in Formamidpuffer pH 8,0 (1g 5,5 Diäthylbarbitursäure auf 100 ml Formamid; pH-Einstellung auf 8,0 mit TEMED) sowie 0,01% Bromphenolblau. Nach dem Auftragen der Probe auf das Gel wurde sie mit Formamid-Puffer pH 8,0 überschichtet (Formamid von Merck GmbH, Darmstadt; Amberlite MB-1 von Serva Feinbiochemika, Heidelberg).

Als Standards wurden ribosomale RNS aus Rattenleberpolysomen aufgetragen, sowie transfer-RNS und unterschiedliche Poly(A)-Sequenzen (Poly(A)₃₃; Poly(A)₉₅; Poly(A)₁₅₄).

Die Elektrophorese erfolgte bei 11–15°C und 115 V über 5–6 h. Anschließend wurde das Gel in 0,2% Methyleneblau (in 50% Methanol) für 3 h gefärbt, in 50% Methanol über Nacht entfärbt und photographiert. Nach Bestimmung der Lauflänge wurde das Gel in die einzelnen Runs zerschnitten, diese wiederum in 3mm-Stücke zerteilt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mittels

eines Teflon-Mörser 30 sec. homogenisiert (nach Zugabe von 300 μ l 0,5 M NaCl zu jeder Gelprobe). Nach Schütteln und Inkubation bei 40-50°C über 15 min wurde die wässrige Phase durch Zentrifugieren gewonnen (15 min/18000 UPM/20°C/SS 34 Rotor) und 92 μ l-Aliquots dieses RNS-haltigen Überstandes in einem Hybridisierungsassay eingesetzt. Somit konnte die Poly(A)-Sequenzlänge der myokardialen mRNS, die nach unterschiedlich langen Aufarbeitungs-Intervallen postmortal zu gewinnen war, den mitgeführten Poly(A)-Standards direkt verglichen werden.

2. Veränderung der myokardialen Genexpression bei Herzmuskelhypertrophie-Regression unter Nifedipin-Therapie

2.1. Tiermodell

Als experimentelles Modell wurden 40 Wochen alte spontan hypertensive Ratten (SHR) benützt, die über 20 Wochen mit Nifedipin in einer Menge von 30 mg pro Kg Körpergewicht und Tag behandelt worden waren.

Als Kontrollen dienten unbehandelte SHR (20-40 Wochen alt) sowie normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY).

Bei dem zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterial handelte es sich um tiefgefrorenes Herzmuskelgewebe aus den linken Ventrikeln der Versuchstiere.

2.2. Chemikalien (siehe unter 1.2.)

2.3. Isolierung myokardialer Gesamt-RNS aus Herzmuskelbiopsien

Zähringer et al. veröffentlichten 1983 eine Methode zur Isolierung und Quantifizierung myokardialer mRNS aus Herzmuskelbiopsien, in der herkömmliche Extrahierungsschritte der RNS modifiziert und mit Hybridisierungstechniken gekoppelt wurden.

Zur Isolierung myokardialer Gesamt-RNS wurden aus den erhaltenen Herzen, die nach der Entnahme in 6,7 mmol Phosphatpuffer pH 7,2 und 0,81% NaCl gespült und tiefgefroren worden waren, mit dem Kings Kardia Bioptom (Fa. Medimex Hamburg) je Herz 4 Biopsien von ca. 2-5,5 mg Gewicht aus dem linken Ventrikel entnommen. Die Homogenisation der Biopsien erfolgte

in 25 μ l 10 mmol Tris/HCl pH 7,4; 5 mmol $MgCl_2$; 300 mmol KCl; 250 mmol Sucrose; 1% Triton-X-100; 100 U/ml Heparin bei 4°C über 30 sec. mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisationsmörser für Eppendorfgefäße.

In einem zweiten Schritt wurden 150 μ l 0,1 mol NaAc pH 5,0 und 16 μ l 10% Na-Sarcosine zugegeben. Nach 10 min Schütteln und Zugabe von 250 μ l H_2O -gesättigtem Phenol sowie 250 μ l Chloroform wurde das Homogenat bei Raumtemperatur für 15 min geschüttelt und durch Zentrifugieren (2-5 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge) der die myokardiale Gesamt-RNS enthaltende wässrige Überstand gewonnen.

2.4. Quantifizierung der myokardialen mRNA im Hybridisierungsassay

Die Hybridisierung der myokardialen mRNA an (3H)-Poly(U) wurde in der bereits unter 1.6. ausführlich beschriebenen Form durchgeführt.

Dabei wurden in einem Assay je 92 μ l der nach Phenolextraktion des Herzmuskelhomogenates gewonnenen, RNS-haltigen wässrigen Phase zusammen mit 100 μ l des Reaktionsmix (10 mmol Tris/HCl pH 7,0; 300 mmol NaCl; 30 mmol Na-Citrat; 747 ng (3H)-Poly(U) (SA 39 uCi/ μ mol P)) eingesetzt.

2.5. Verschiedenes

Die Kontrolle des arteriellen Blutdruckes aller Versuchstiere erfolgte durch Messung an der Schwanzarterie. Körpergewicht und Herzgewicht der Tiere, insbesondere das Gewicht des linken Ventrikels, wurden ebenfalls bestimmt.

Die myokardiale Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit Rinder-Serumalbumin als Standard gemessen. Die Gesamt-RNS-Konzentration wurde jeweils - neben der spektrophotometrischen Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm - auch direkt quantifiziert: ihre Bestimmung erfolgte zusammen mit der Messung der myokardialen DNS-Konzentration nach der Arbeitsanleitung von Munro und Fleck (1966).

IV. ERGEBNISSE

1. Kinetik der Proteinsynthese im Myokard post mortem

Im Mittelpunkt des vorliegenden Abschnittes steht die Frage nach der Kinetik der myokardialen Proteinsynthese postmortal als Folge eingreifender Veränderungen der Genexpression im absterbenden, hypoxischen Myokard und die Beeinflussung dieser Parameter durch unterschiedliche Umgebungstemperatur (Raumtemperatur/Eistemperatur).

Zur Erfassung der zu erwartenden Veränderungen der myokardialen Genexpression dient folgendes, aus fünf Untersuchungsschritten bestehendes Versuchsmodell:

1. Isolierung myokardialer Gesamt-RNS
2. Zellfreie in vitro-Translation der myokardialen mRNS
3. Identifizierung der neu synthetisierten Proteine
4. Quantifizierung der myokardialen mRNS im Hybridisierungsassay
5. Sequenzierung der Gesamt-RNS auf Formamidgelen und Identifizierung der mRNS-Sequenzlängen durch Hybridisierung

Im folgenden sollen zunächst die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen dargestellt und in der unter 1.6. anschließenden Diskussion zueinander in Bezug gestellt und kritisch erörtert werden.

1.1. Isolierung myokardialer Gesamt-RNS

Die Herzen von jeweils zwei SD-Ratten mit ca. 150 g Körpergewicht wurden gepoolt und die myokardiale Gesamt-RNS isoliert wie in Abschnitt III.1.3. beschrieben. Die Isolierung der Gesamt-RNS erfolgte nach festgelegten Zeitintervallen (0 min/10 min/20 min/30 min/60 min/2 h/4 h/8 h/24 h/48 h/72 h/96 h/120 h) postmortal, während derer die aufzuarbeitenden Herzen in physiologischer NaCl-Lösung bei Raumtemperatur sowie in Eis gelagert wurden.

Die strukturelle Integrität der nach den beschriebenen Methoden isolierten Gesamt-RNS war bereits 1981 von Zähringer et al. durch Analyse des Sedimentationsverhaltens auf kontinuierlichen 10-40% Sucrose-Gradienten nachgewiesen worden; ihre funktionelle Integrität wurde durch die in

III.1.4. beschriebene zellfreie in vitro-Translation untersucht.

Die quantitative Erfassung der isolierten Gesamt-RNS erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte in einem Gillford-Spectrophotometer bei 260 nm aus Mehrfachmessungen von aliquots der pro Aufarbeitung erhaltenen Gesamt-RNS-Mengen. In Tabelle 5 sind die Werte der myokardialen Gesamt-RNS je Zeitintervall postmortal und Lagerungstemperatur aufgeführt, wobei die dargestellten Mittelwerte sich ergeben aus jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Dreifach-Aufarbeitungen des unter standardisierten Bedingungen gehandhabten Herzmuskelgewebes. Abbildung 5 zeigt graphisch die Zeitkinetik der myokardialen Gesamt-RNS postmortal in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur.

Innerhalb eines ersten Intervalles von 0 min bis 2 h postmortal ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede im extrahierbaren Gehalt an myokardialer Gesamt-RNS zwischen den bei 0°C und den bei Raumtemperatur (RT) gelagerten Aliquots von Herzmuskelgewebe; Schwankungen der erhaltenen Werte myokardialer Gesamt-RNS (zwischen 1122 ug/g Herzgewicht und 1238 ug/g Hg; siehe Tabelle) in diesem Zeitraum sind graphisch vernachlässigbar, da sie innerhalb der Standardabweichungen liegend als nicht-signifikant angesehen werden müssen.

Nach 2 h postmortal fällt die extrahierbare Menge an Gesamt-RNS aus bei RT gelagertem Gewebe jedoch drastisch um etwa 30% der Ausgangsmenge auf Werte von 730 ug/g Hg ab; nach 24 h lassen sich nur noch ca. 33% extrahierbarer myokardialer Gesamt-RNS nachweisen, nach 48 h war die Ausbeute weiter abgesunken auf 16,5% bzw. 186 ug/g Hg und nach 72 h postmortal war bei völliger Degradation der myokardialen Gesamt-RNS-Sequenzen bei RT im bereits makroskopisch autolytischen Herzmuskelgewebe keine extrahierbare Gesamt-RNS mehr zu quantifizieren.

Im Gegensatz zu diesen Befunden war bei dem in Eis gelagerten Herzmuskelgewebe in einem Zeitintervall von 0 min bis 8 h postmortal kein nennenswerter Rückgang der extrahierbaren Menge an myokardialer Gesamt-RNS festzustellen. Auch im weiteren Verlauf kam es offenbar nicht zur fulminanten Degradation myokardialer Gesamt-RNS-Sequenzen, wie dies im bei RT gelagerten Herzmuskelgewebe zu beobachten war; vielmehr sank der Gehalt extrahierbarer Gesamt-RNS zwischen 8 h und 24 h postmortal kontinuierlich und langsam um ca. 8-10% auf 1092 ug/g Hg ab. Erst nach Ablauf von mehr als 24 h postmortal war ein deutlicher Abfall im myokar-

dialen Gesamt-RNS-Gehalt des bei 0°C gelagerten Gewebes zu dokumentieren (zwischen 24 h und 48 h lagen die erhaltenen Werte bei 50% der Ausgangsmenge myokardialer Gesamt-RNS).

Bemerkenswert erscheint ferner, daß nach einem Intervall von etwa 48 h kein weiterer wesentlicher Rückgang des extrahierbaren Gesamt-RNS-Gehaltes mehr zu beobachten war: zwischen 48 h und 120 h postmortal nahmen die erhaltenen Werte um nur noch etwa 3-5% des Ausgangswertes myokardialer Gesamt-RNS ab, sodaß die Versuchsreihe mit bei 0°C gelagertem Herzmuskelgewebe zu diesem Zeitpunkt (120 h post mortem: 587 ug/g Herzwergicht; entsprechend 50% des Ausgangswertes) abgebrochen wurde.

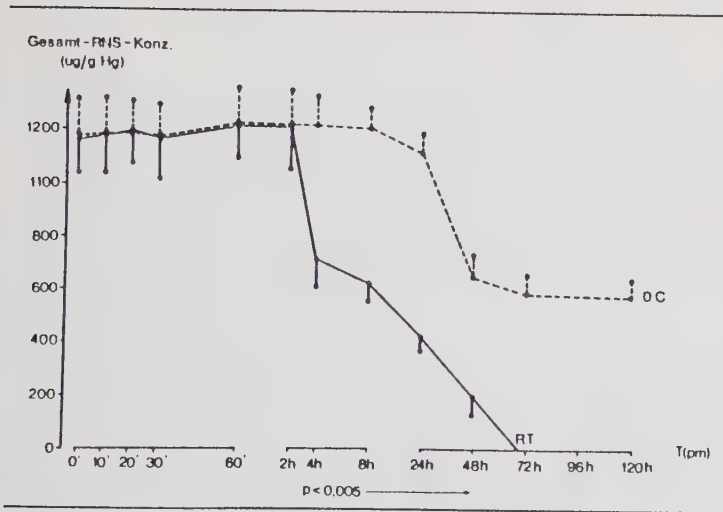


Abbildung 5: Zeitkinetik der myokardialen Gesamt-RNS postmortal in Abhängigkeit von der jeweiligen Lagerungstemperatur (0°C bzw. Raumtemperatur) des Herzmuskelgewebes in 0,9% NaCl-Lösung

	myokardiale mRNS-Konzentration (in ug mRNS/g Hg)		myokardiale Gesamt-RNS-Konzentration (in ug G-RNS/g Hg)	
Zeit postmortal	0°C	RT	0°C	RT
0 min	61 ± 8	60 ± 5	1173 ± 56	1122 ± 220
10 min	57,3 ± 9	57 ± 6	1238 ± 54	1136 ± 200
20 min	53,5 ± 11	52 ± 7	1229 ± 241	1172 ± 169
30 min	54,3 ± 8	53,5 ± 9	1212 ± 194	1210 ± 186
60 min	49,8 ± 10	50 ± 9	1180 ± 403	1200 ± 190
2 h	43,3 ± 7	44,6 ± 8	1191 ± 76	1199 ± 178
4 h	45 ± 8	28 ± 5	1187 ± 101	730 ± 166
8 h	47,8 ± 9	18,3 ± 3	1208 ± 190	660 ± 140
24 h	36 ± 7	14,6 ± 3	1092 ± 144	428 ± 110
48 h	28 ± 6	11,2 ± 4	624 ± 21	186 ± 16
72 h	24,7 ± 5	---	576 ± 40	---
96 h	23,2 ± 5	---	565 ± 18	---
120 h	22,4 ± 4	---	587 ± 30	---

Tabelle 5: Kinetik der mRNS- und Gesamt-RNS-Konzentrationen zu den jeweils angegebenen Zeitintervallen post mortem in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur (Mittelwerte aus Dreifach-Messungen ± SD)

Mit diesen Beobachtungen decken sich Ergebnisse von Zähringer et al. (1981), die zeigen konnten, daß Einfrieren von Herzmuskelgewebe bzw. Lagerung bei 4°C über 24 h keinen Einfluß auf die Ausbeute myokardialer Polyribosomen nimmt, während es nach Lagerung des Gewebes bei RT über den gleichen Zeitraum von 24 h zum Verlust des Großteils extrahierbarer myokardialer Polyribosomen kommt (über 70% Verluste). Aus dieser Beobachtung, daß Lagerung bei Eistemperatur über 24 h keine wesentliche Beeinträchtigung der Ausbeute an Gesamt-RNS oder Polyribosomen aus Herzmuskelgewebe zur Folge hat, erscheinen die beschriebenen Isolierungsbedingungen gut anwendbar in allen Fällen, in denen Herzmuskelgewebe nach der Entnahme nicht sofort aufgearbeitet werden kann, wie etwa am Leichenherzen, bei herzchirurgisch entferntem Gewebe oder bei Herzmuskelbiopsien, die während einer Katheter-Untersuchung entnommen wurden.

1.2. Ergebnisse der BRL-in vitro-Translation

Im Anschluß an die Quantifizierung der myokardialen Gesamt-RNS wurde zur Beurteilung ihrer funktionellen Integrität die zellfreie Translation der (in der je Zeitintervall postmortal extrahierten Gesamt-RNS-Präparation enthaltenen) myokardialen mRNS im BRL-in vitro-System nach der unter III.1.4. beschriebenen Methode im Rabbit-Retikulozyten-Lysat durchgeführt. Dieses Retikulozyten-System, das durch Behandlung mit Ribonuklease mRNS-abhängig wird, da es einen niedrigen endogenen mRNS-Gehalt besitzt, translatiert mit hoher Effizienz exogene, heterologe mRNS in Protein. Verwendet wurde eine Modifikation der von Mans und Novelli 1961 beschriebenen Methode, die von Zähringer et al. 1981 nach Austestung der verschiedenen vorkommenden Variablen als neue Standardisierung der bekannten Inkubationsbedingungen publiziert wurde und individuelle mRNS-Moleküle in einer gegebenen Präparation myokardialer Gesamt-RNS optimal translatiert.

Vor dem Ansetzen des Translationsassays wurde jedoch zunächst die Sättigungskinetik unterschiedlicher Mengen der im Assay eingesetzten myokardialen Gesamt-RNS ausgetestet, um die Aussagekraft bezüglich der postmortal noch vorhandenen Translationsaktivität der isolierten Gesamt-RNS zu optimieren (siehe Abbildung 6).

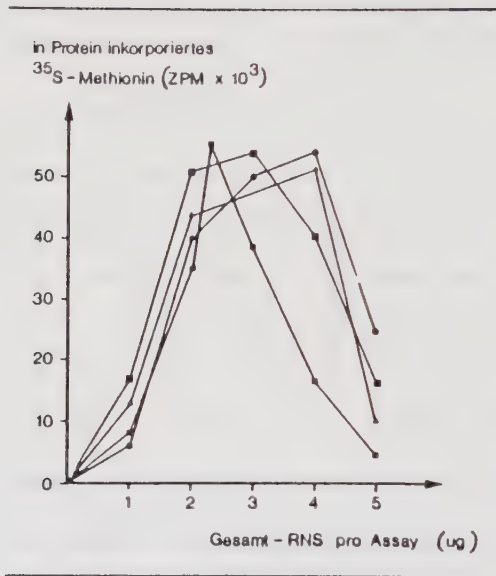


Abbildung 6: In vitro-Translation myokardialer mRNA im Rabbit-Retikulum-zyten-Lysat-System: Sättigungskinetik unterschiedlicher Mengen an aliquotierter Gesamt-RNS (Endkonzentrationen im Assay)

Mehrfach-Austestungen von Aliquots myokardialer Gesamt-RNS in unterschiedlichen Konzentrationen pro Assay ergaben Maximalwerte inkorporierter Radioaktivität zwischen 2,0 und 4,0 μg Gesamt-RNS pro Assay. Um die Bestimmung der postmortalen Translationskapazität weitgehend unabhängig von dieser beobachteten Inter-Assay-Varianz durchzuführen, wurden von jeder zu untersuchenden Gesamt-RNS-Probe (d.h. von drei je Zeitintervall postmortal extrahierten Gesamt-RNS-Präparationen) jeweils Aliquots von 2, 3 und 4 μg Gesamt-RNS pro Assay eingesetzt und die erhaltenen Werte gemittelt.

2 μg myokardialer Gesamt-RNS induzierten in einem 30 μl -Assay die

Inkorporation von 49 010 ZPM (^{35}S)-Methionin in Protein in einem 2,7 μl Aliquot (Leerwert als minus-mRNS-Kontrolle bei 34 320 ZPM).

Abbildung 7 zeigt graphisch die Kinetik der Translationsaktivität im *in vitro*-Assay zu den angegebenen Zeiten post mortem für beide Temperaturbereiche:

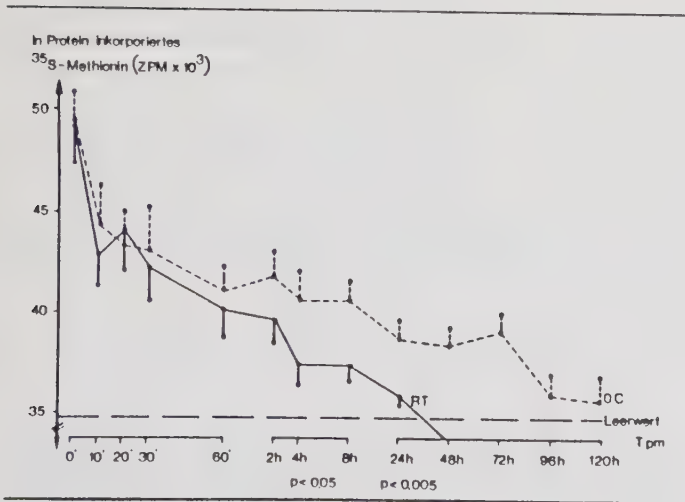


Abbildung 7: Kinetik der Aktivität myokardialer mRNS im BRL-*in vitro*-Translationsassay

Die Mengen an inkorporierter Radioaktivität und damit die Translationskapazität der myokardialen mRNS-Extrakte sowohl aus bei RT als auch bei 0°C gelagertem Herzmuskelgewebe fallen in dem ersten Zeitintervall (0 min bis 60 min postmortal) nahezu parallel zueinander um etwa 50% des

Ausgangswertes ab, wobei augenscheinlich ein erster, deutlicher Rückgang der Translationsaktivität bereits innerhalb von 10 min post mortem zu verzeichnen ist; auch diesbezüglich besteht ein nur geringfügiger Unterschied zwischen dem bei RT und dem bei 0°C gelagerten Gewebe. Erst im weiteren Verlauf (ab 60 min postmortal) unterscheiden sich beide Kurven deutlich voneinander: während die Translationsaktivität der Gesamt-RNS-Extrakte aus bei RT gelagertem Herzmuskelgewebe weiter stark abfällt (nach bereits 24 h liegen die Werte unterhalb des Leerwertes des Assays im nicht mehr verwertbaren Bereich), sinkt die Aktivität der Gesamt-RNS aus bei 0°C gelagertem Herzmuskelgewebe weitaus langsamer ab, um auch nach 120 h postmortal noch nicht in den Bereich des Leerwertes abgesunken zu sein.

Die funktionelle Integrität myokardialer Gesamt-RNS, die offensichtlich bei Temperaturen um den Gefriergrad deutlich länger erhalten bleibt, als dies bei Raumtemperatur der Fall ist, soll im folgenden Abschnitt anhand der Identifizierung der in vitro neusynthetisierten myokardialen Proteine näher untersucht werden.

1.3. Identifizierung neu-synthetisierter myokardialer Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Slabgels

Die Analyse und Identifizierung der mRNS-induzierten in vitro-synthetisierten myokardialen Proteine ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der funktionellen Integrität des mRNS-Anteils in der extrahierten myokardialen Gesamt-RNS-Präparation.

Verwendet wurde dazu eine Kombination von SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese (zur Auftrennung der neu synthetisierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht) und anschließender Fluorographie zur Sichtbarmachung der radioaktiv markierten Proteine (methodische Details: III.1.5.)

Die zellfreie Synthese myokardialer Proteine sowohl im Rabbit-Retikulozyten-Lysat-System als auch vergleichend im Weizenkeim-System war bereits 1981 von Zähringer et al. durchgeführt worden.

Neben der Bestimmung von Molekulargewicht und Identität der neusynthetisierten Proteine durch Vergleich mit radioaktiven und nicht-radioaktiv markierten Standard-Proteinen, die gleichzeitig zur Elektrophorese mit auf das Gel aufgetragen worden waren (siehe Abbildung 8), gelang es in

dieser Untersuchung, neben der Identifizierung und Analyse einzelner myokardialer Proteine auch, den prozentualen Anteil zu bestimmen, in dem die verschiedenen mRNS-Spezies im Herzmuskel vorliegen (Zähringer et al. 1981). Hierbei zeigte sich, daß beide Systeme die wichtigsten myokardialen Proteine und darüber hinaus verschiedene andere, noch nicht eindeutig identifizierte Proteine zellfrei effizient synthetisieren können; die Synthese längerkettiger Proteine war dabei im Rabbit-Retikulozyten-Lysat-System wesentlich effizienter erfolgt als im Weizenkeim-System, das zu vorzeitiger Proteinkettentermination tendiert. Die zunächst unbefriedigende Neusynthese und schlechte Darstellbarkeit der Myosin-II-Ketten, die wohl methodenabhängig auf der Degradation der MHC-mRNS während ihrer Isolierung beruhte, konnte von Zähringer (1981) durch die Einführung modifizierter, schonenderer Aufarbeitungsmethoden wesentlich verbessert werden.

Die strukturelle und funktionelle Integrität der wichtigsten, die myokardiale Genexpression und Proteinsynthese bedingenden Faktoren in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur postmortal war in den vorausgegangenen Abschnitten anhand der Kinetik des myokardialen Gesamt-RNS-Gehaltes sowie der Translationsaktivität der myokardialen mRNS bereits untersucht worden.

In Abbildung 9 ist die Proteinsynthese-Kapazität bei in vitro-Translation myokardialer mRNS, die in den - nach verschiedenen Zeitintervallen postmortal - extrahierten Gesamt-RNS-Präparationen mitenthalten ist, dargestellt. Die Abbildung zeigt eine Zusammenstellung zweier Gele, wobei die in den jeweiligen Läufen aufgetragene Proteinprobe nach Lagerungstemperatur und -Zeitintervall post mortem bezeichnet ist. Es wurden jeweils gleiche Mengen (1 μ l) der einzelnen zellfrei translatierten mRNS-Proben aufgetragen, sowie vergleichend Standardproteine (Lactoglobulin, Myosin) und als Leerwert mRNS-freier Translationsmix. Es ist leicht zu erkennen, daß sowohl die bei RT schneller degradierte myokardiale Gesamt-RNS bzw. die darin enthaltenen mRNS-Moleküle, als auch die bei 0°C quantitativ und qualitativ hochwertigeren mRNS-Sequenzen das grundsätzlich gleiche Muster myokardialer Proteine synthetisieren; die deutliche Abschwächung der Banden nach 4 h post mortem bei RT spricht jedoch für eine hier deutlich verminderte Anzahl an Proteinen, analog

der stark abgefallenen Translationsaktivität der bei RT gelagerten Gesamt-RNS-Präparationen.

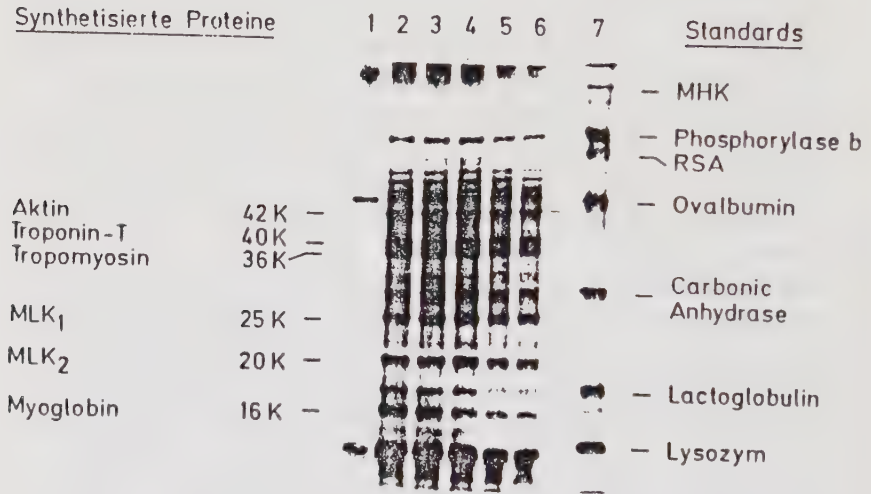


Abbildung 8: Beispiel zellfreier Synthese myokardialer Proteine durch myokardiale mRNS im Rabbit-Retikulozyten-Lysat-System

Myokardiale mRNS (in jeweils 2, 3 und 4 ug Gesamt-RNS-Präparationen enthalten) wurde im mRNS-abhängigen BRL-Retikulozyten-Lysat-System translatiert, die zellfrei synthetisierten Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht.

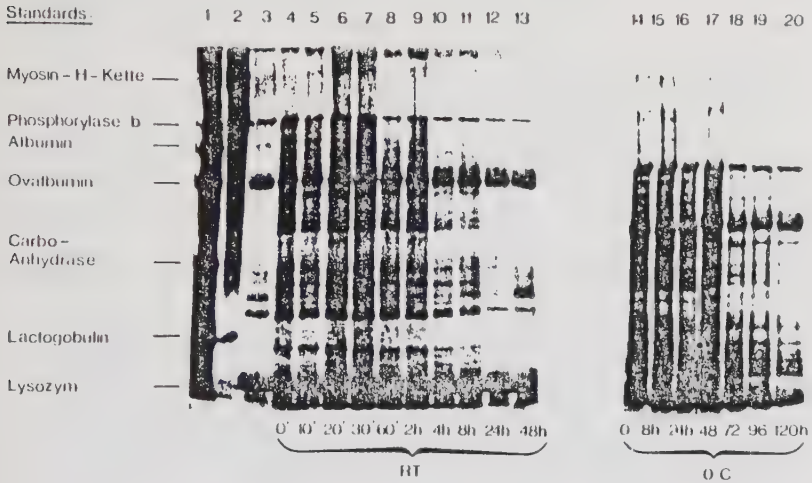


Abbildung 9: Auftrennung der in vitro neusynthetisierten Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Gelen;

Dargestellt sind neben den in Lauf 1 (Lactoglobulin) und Lauf 2 (Myosin) aufgetragenen Standards sowie dem Leerwert (Lauf 3 als minus-mRNS-Kontrolle) die Proteine, für die die zu den angegebenen Zeitintervallen postmortal extrahierten mRNS-Sequenzen codierten:

Lauf 4 - 13 stellt die Translationsprodukte der postmortal bei RT gelagerten mRNS dar; hier zeigt sich die deutliche Minderung der Translationsaktivität des Assays zwischen 2 und 4 h post mortem in einer Abschwächung der radioaktiv markierten Banden (ab 4 h pm).

Lauf 14 - 20 zeigt die Translationsprodukte der bei 0°C gelagerten mRNS: Zu einer Verminderung der Translationsaktivität kommt es hier erst zwischen 48 und 72 h pm. Das Muster der synthetisierten Proteine ändert sich jedoch bei keiner der Versuchsreihen zu irgendeiner Zeit postmortal.

Aus diesen Ergebnissen kann ersehen werden, daß die absolute Menge an Gesamt-RNS bzw. ihres mRNS-Anteils im Herzmuskel postmortal bei RT sehr viel schneller abnimmt, als bei Eistemperatur und daß ferner die spezifische Syntheseaktivität pro μg mRNS bereit 2 h postmortal deutlich schwindet. Der Anteil degradiert mRNS ist rasch progredient, jedoch enthält ohne Zweifel jede methodisch noch quantifizierbare Menge myokardialer Gesamt-RNS noch Spuren intakter mRNS, die zur Synthese der wesentlichen myokardialen Proteine fähig ist.

Ein Umverteilung innerhalb der einzelnen mRNS-Spezies findet zu keiner Zeit statt; es werden nach wie vor alle wichtigen Proteine ohne Änderung ihrer relativen Verteilung zueinander synthetisiert.

Die Degradation der myokardialen mRNS post mortem ist demnach unspezifisch.

1.4. Quantifizierung myokardialer mRNS durch Hybridisierung an (^3H)Poly(U)

Durch den Einsatz bisher üblicher Methoden der Isolierung mikrosomaler Gesamt-RNS durch SDS-Phenolextraktion und anschließender Trennung der Poly(A)-enthaltenden mRNS aus der Gesamt-RNS-Präparation durch Affinitätschromatographie an Oligo-dt-Cellulose (Aviv und Leder, 1972) war die Bestimmung geringer Mengen an myokardialer mRNS nicht möglich.

Die Quantifizierung myokardialer mRNS im Nanogramm-Bereich und die Analyse von Veränderungen der mRNS-Konzentration im Herzmuskelgewebe unter verschiedenen, auch pathologischen, Bedingungen war erst durch die Einführung zweier neuer Techniken möglich geworden:

- a) Hybridisierung von mRNS an (^3H)Poly(U)
(Gillespie et al. 1972; Jeffery und Brawerman 1974) und
- b) Hybridisierung von mRNS an komplementäre DNS (cDNS)
(u.a. Kacian et al. 1972)

Zähringer et al. (1982) benutzten zu detaillierten Untersuchungen der mRNS die Technik der Hybridisierung der Poly(A)-enthaltenden mRNS an (^3H)Poly(U) und konnten in diesen Versuchsreihen den Poly(A)-Gehalt myokardialer mRNS (4,3% der mRNS), den Anteil myokardialer mRNS an der Gesamt-RNS-Präparation (3,4% der Gesamt-RNS) sowie die Länge der Poly(A)-Sequenz (ca. 88 Adenin-Nukleotide) ermitteln und über die Kenntnis

ihres Poly(A)-Gehaltes mRNA-Mengen in Proben unbekannten mRNA-Gehaltes bestimmen. Ebenso gelang es mittels der Hybridisierungstechnik, den geringen Gehalt an mRNA in Herzmuskelbiopsien zu messen, die einer direkten Bestimmung des mRNA-Gehaltes durch mRNA-Isolierung aus mengenmäßigen Gründen nicht zugänglich sind.

Im Gegensatz zur direkten Isolierung aus Herzmuskel, für die mindestens 1-2 g Gewebe benötigt werden (entsprechend einer isolierbaren mRNA-Menge von 20-40 µg mRNA), liegt die untere Nachweisgrenze bei Anwendung der Hybridisierungstechnik bei etwa 25-50 ng myokardialer mRNA, also rund tausendfach niedriger (Zähringer, 1982). Dies bedeutet eine wesentliche Steigerung der Nachweissensitivität myokardialer mRNA, wobei auch die methodisch einfachere und schnellere Handhabung der Hybridisierungstechnik es erlaubt, den Abfall des mRNA-Gehaltes innerhalb kurzer Zeitintervalle postmortal rasch zu quantifizieren.

Hinzu kommt, daß bei der Isolierung myokardialer mRNA methodisch bedingte Verluste an mRNA während der einzelnen Isolierungsschritte unvermeidbar sind und dadurch die extrahierbare der tatsächlich im Herzmuskel vorhandenen mRNA-Menge nicht entspricht. Durch Quantifizierung der mRNA bereits während der ersten Isolierungsschritte (durch Hybridisierung an (³H)Poly(U)) wird der Großteil dieser Verluste vermieden und die myokardiale mRNA durch größere Sensitivität bei hoher Spezifität der Methode zuverlässiger bestimmbar (Zähringer, 1982).

Abbildung 10 stellt die Zeitkinetik der aus dem bei 0°C bzw. bei RT gelagerten Herzmuskelgewebe isolierten mRNA-Konzentrationen dar:

Der innerhalb der beiden ersten Stunden postmortal zu beobachtende Abfall an extrahierbarer myokardialer mRNA um etwa 25% des Ausgangswertes (bei sofortiger Aufarbeitung post mortem waren etwa 60 µg mRNA pro g Herzmuskelgewicht zu isolieren) verläuft für beide Versuchsreihen nahezu völlig parallel. Erst in einem Intervall von 2-8 h postmortal unterscheiden sich die Konzentrationen isolierbarer myokardialer mRNA aus gekühltem und nicht-gekühltem Gewebe deutlich voneinander:

Während in bei 0°C gelagertem Gewebe keine weitere Abnahme des myokardialen mRNA-Gehaltes zu beobachten ist (8 h postmortal lagen die Werte hier noch immer bei etwa 45 µg mRNA/1 g Herz), sondern eine plateauförmige Stabilisierung, die auf eine Stagnation der Degradation myokardialer mRNA bei 0°C schließen läßt, fällt die mRNA-Konzentration bei RT in

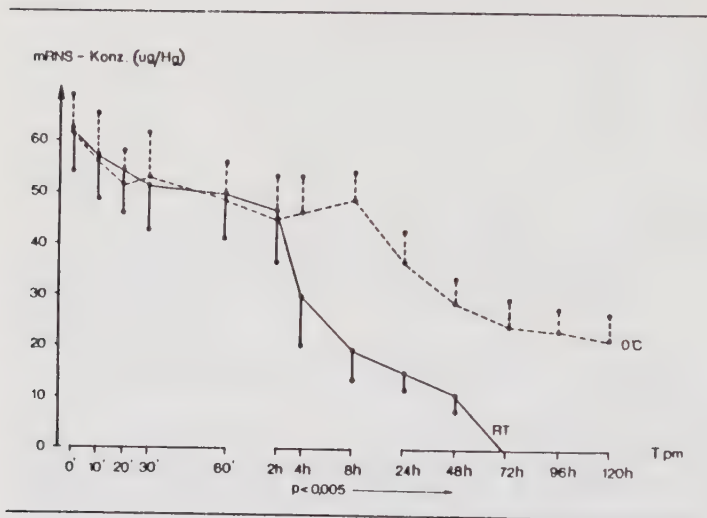


Abbildung 10: Zeitkinetik der myokardialen mRNS postmortal:

Graphische Darstellung der zu angegebenen Zeitintervallen post mortem extrahierbaren mRNS-Konzentrationen bei 0°C sowie bei Raumtemperatur (RT)

diesem Intervall am raschesten ab (nach 8 h post mortem auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes; etwa 18 ug mRNS/l g Hg). Nach 24 h post mortem lassen sich nur noch etwa 25% der mRNS-Ausgangswerte nachweisen, nach 48 h war es zu einem weiteren Abfall auf etwa 16,5% gekommen und nach 72 h postmortal war bei RT keinerlei myokardiale mRNS zu isolieren. Zu diesem Zeitpunkt (72 h post mortem) liegen im gekühlten Gewebe noch etwa 40% der Ausgangskonzentration myokardialer mRNS vor und auch nach 120 h lassen sich hier noch immerhin ca. 33% der mRNS aus dem Gewebe isolieren.

Dieser deutliche und rasch einsetzende Abfall isolierbarer mRNA aus bei RT gelagertem Herzmuskelgewebe - im Vergleich zur Situation am gekühlten Gewebe - war aus der Synopsis der bereits vorliegenden Ergebnisse zu erwarten und soll im folgenden Abschnitt hinsichtlich der Sequenzlänge der degradierenden mRNA näher untersucht werden.

1.5. Auftrennung und Identifizierung der Poly(A)-Sequenzlänge myokardialer mRNA auf Formamidgelen

Zur Identifizierung der Poly(A)-Sequenzlänge der myokardialen mRNA wurden im Assay alle RNS-Sequenzen mit RNase A und RNase T₁ verdaut bis auf die Poly(A)-Sequenzen (Methodik unter III.1.7.).

Die einzelnen Proben der solcherart vorbehandelten Gesamt-RNS-Präparationen (bei RT: 0 min/2 h/4 h/24 h und bei 0°C: 0 min/24 h/48 h/72 h postmortal als jeweils ausgewählte Proben) waren zur Auftrennung nach Molekulargewicht bzw. Sequenzlänge auf Formamidgele aufgetragen worden zusammen mit radioaktiv markierten und gefärbten Standards als Marker-Sequenzen: Poly(A)₃₃; Poly(A)₉₅; Poly(A)₁₅₄ sowie t-RNS.

Die einzelnen RNS des Formamidgels, die die unverdauten Poly(A)-Sequenzen der myokardialen mRNA - aufgetrennt nach ihrem Molekulargewicht bzw. nach ihrer Sequenzlänge - enthalten, wurden in 3mm-Abschnitte zerteilt und diese einzeln im Hybridisierungsassay analysiert; somit kann der Poly(A)-Gehalt der einzelnen RNS, also jeweils pro Zeitintervall postmortal extrahierbarer Gesamt-RNS-Präparation, annähernd "kontinuierlich" bestimmt werden. Aus der Verteilung der Radioaktivität im Hybridisierungsassay kann die Wanderung der Poly(A)-Sequenzen der myokardialen mRNA bildhaft gemacht und den mitgeführten Poly(A)-Standards unterschiedlicher Sequenzlänge verglichen werden.

Die auf semilogarithmischer Skala geplotteten Werte der Standards erlauben die Bestimmung der mittleren Sequenzlänge der in der Gesamt-RNS-Präparation enthaltenen Poly(A)-Sequenzen und damit die Errechnung der Sequenzlänge der nach unterschiedlichen Zeitintervallen postmortal extrahierbaren mRNA. Diese Berechnungen basieren auf den Arbeiten von Zähringer et al. (1982), die die durchschnittliche Länge der Poly(A)-Sequenzen myokardialer mRNA (ca. 88 Nukleotide; entsprechend etwa 4,3% der mRNA-Sequenzlänge von 2050 Nukleotiden) anhand der Analyse auf Poly-

acrylamid-Formamid-Gelen bestimmten und die erhaltenen Werte kontrollierten durch Ermittlung der mRNS-Sequenzlänge auf Sucrose-Gradienten.

Die Ergebnisse beider Methoden koinzidierten in so hohem Maße, daß diese Werte als signifikante, gültige Rechengrundlage für weitere Bestimmungen gelten.

Abbildung 11 zeigt die Verteilung der Poly(A)-Marker von unterschiedlicher Länge und Molekulargewicht (33-;95-;154-Nukleotid-Sequenzen) in den einzelnen Runs (Abb. 11 a) und darunter jeweils zugeordnet die zu verschiedenen Zeitintervallen post mortem extrahierbaren Poly(A)-Sequenzen aus den Gesamt-RNS-Präparationen des bei RT (Abb. 11 b) und des bei 0°C (Abb. 11 c) gelagerten Herzmuskelgewebes.

Bestimmt wurde die Poly(A)-Sequenzlänge aus dem höchsten Peak unter mehreren niedrigeren, aus dem die Hauptmenge der noch intakten mRNS abgelesen werden kann. Niedrigere Peaks bezeichnen kürzere, degradierte Poly(A)-Sequenzen der postmortal bereits zerstörten mRNS, die aufgrund ihres geringeren Molekulargewichtes weiter wandern als der Hauptgipfel.

Aus Abbildung 11 b wird der rasche Zerfall längerkettiger Poly(A)- bzw. mRNS-Sequenzen bereits innerhalb weniger Stunden postmortal in dem bei RT gelagerten Gewebe deutlich:

Während der Peak der sofort postmortal extrahierten mRNS-Präparation mit dem Peak des Poly(A)₁₅₄-Markers koinzidiert und hier der größte Teil der isolierten mRNS-Sequenzen somit in Form intakter, langkettiger Nuklidsequenzen vorliegt, verringert sich die mittlere Länge der gewonnenen Poly(A)- bzw. mRNS-Sequenzen bei RT bereits nach 2-4 h post mortem auf die Länge des Poly(A)₉₅-Standards und zu 24 h postmortal liegen nur noch degradierte, kurzkettige Poly(A)-Sequenzen mit etwa 33 Nukleotiden oder weniger vor.

Ein deutlicher Abfall der inkorporierten Radioaktivität dokumentiert neben dem qualitativen Verlust längerkettiger Poly(A)-Sequenzen durch Degradation auch die quantitative Abnahme des im Hybridisierungsassay an (³H)Poly(U) koppelnden Poly(A): Die Menge inkorporierter Radioaktivität sinkt von etwa 5000 ZPM (0 min) innerhalb von 24 h auf unter 2000 ZPM.

Im Vergleich dazu zeigt das bei 0°C gelagerte Herzmuskelgewebe erwartungsgemäß eine größere Stabilität der langkettigen Poly(A)-Sequenzen (nach 24 h liegt der Peak im Bereich von Poly(A)₉₅; erst nach 72 h postmortal

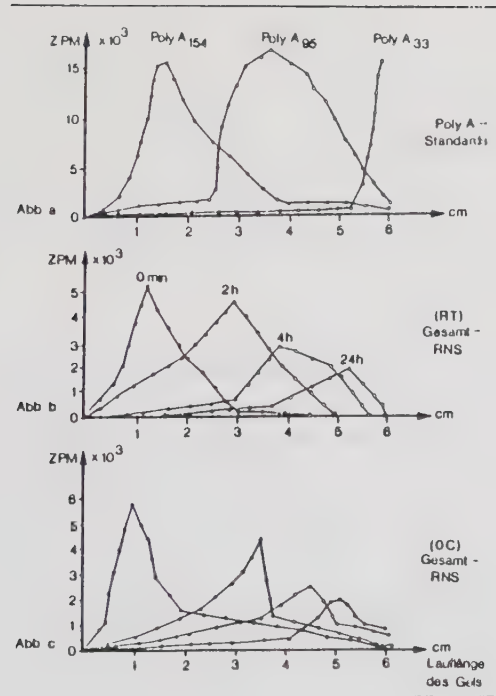


Abbildung 11: Auftrennung und Identifizierung niedermolekularer Gesamt-RNS-Sequenzen auf Formamidgelen und Charakterisierung der Poly(A)-Sequenzlängen der jeweiligen mRNS-Präparationen: Verteilung der Poly(A)-Marker (11 a); bei RT (11 b) und bei 0°C (11 c) gelagerte mRNS-Proben

sind die Poly(A)-Sequenzen auf eine durchschnittliche Länge von 33 Nukleotiden oder weniger degradiert. Auch die Menge der je Zeitintervall postmortal noch vorhandenen Poly(A)-bzw. mRNS-Sequenzen, dokumentiert durch das Ausmaß der Hybridbildung, liegt im gekühlten Herzmuskelgewebe deutlich höher als im vergleichbaren, postmortal bei RT gelagerten Myokardgewebe (Abb. 11 c).

Die Synopsis der in den vorausgegangenen Abschnitten dargelegten Ergebnisse unterstreicht die Bedeutung der Umgebungstemperatur für die funktionelle Integrität der Myokardzelle post mortem, die sich in der Kinetik der myokardialen Proteinsynthese dokumentiert bzw. im Verlauf der wichtigsten die myokardiale Genexpression bedingenden Parameter.

In der folgenden Diskussion sollen diese Veränderungen der Genexpression im absterbenden Myokard zusammenfassend betrachtet werden.

1.6. Diskussion

Zahlreiche Arbeiten haben in den letzten Jahrzehnten durch neue Möglichkeiten der Isolierung und Charakterisierung eukaryonter Gesamt-RNS und mRNS dazu beigetragen, das Verständnis für die Mechanismen der Genexpression und Proteinsynthese wesentlich zu erweitern und zu vertiefen.

Am Herzmuskel, der aufgrund seiner durch die myofibrilläre Struktur bedingten, rigiden Morphe mit herkömmlichen molekularbiologischen Methoden nur sehr schwierig zu untersuchen war, gelang erstmals Zähringer (1981) die standardisierte und effiziente Isolierung intakter Polyribosomen, Gesamt-RNS und mRNS. Dem Nachweis der strukturellen Integrität der extrahierten Nukleotidsequenzen diente die Analyse des Sedimentationsverhaltens auf Sucrose-Gradienten; die funktionelle Integrität der myokardialen mRNS wurde durch zellfreie Translation anhand des Nachweises neu synthetisierter kompletter Proteine gezeigt.

Die Einführung der Hybridisierung Poly(A)-enthaltender mRNS an (^3H)Poly-(U) ermöglichte die schnelle und direkte Quantifizierung der mRNS-Konzentration aus in vivo entnommenen Gewebeproben ebenso wie aus eingefrorenem Material (Zähringer, 1982); wobei die Nachweisgrenze der mRNS im Hybridisierungsassay, dessen hohe Sensitivität die Bestimmung von 25-50 ng mRNS pro 1 g Herz erlaubt, im Vergleich zur direkten mRNS-Isolierung um etwa das 1000-fache niedriger liegt.

Die Bestimmung des mRNA-Gehaltes aus Herzmuskelbiopsien - und damit die Beurteilung der Proteinsynthese-Aktivität im menschlichen Myokard in vivo - zeigt somit Möglichkeiten auf, die durch die Eröffnung neuer Aspekte in der Früherkennung der Erkrankungen des Herzmuskels für den Kliniker von besonderem Interesse sein müssen.

In dem ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte mit den zur Verfügung stehenden Methoden der Isolierung und Charakterisierung myokardialer Gesamt-RNS und mRNA (Zähringer, 1981) die Zeitkinetik der Proteinsynthese und damit die Modifikation der Genexpression im Herzmuskel post mortem untersucht und in ihrer Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur (0°C bzw. RT) dargestellt werden.

Die Isolierung myokardialer Gesamt-RNS-Sequenzen zeigte zunächst in einem Zeitintervall von 0 min - 2 h postmortal in beiden Temperaturbereichen keine Abnahme der Ausbeute an Gesamt-RNS. Innerhalb dieses Zeitraumes kommt es im absterbenden Myokard offenbar nicht zu verstärkter Degradation aller myokardialen Gesamt-RNS-Sequenzen.

Im Gegensatz zur quantitativen Stabilität des großen Pools der Gesamt-RNS innerhalb der beiden ersten Stunden post mortem zeigt sich bereits 60 min postmortal ein deutlicher, spezifischer Abfall der mRNA-Sequenzen, der im Hybridisierungsassay an (³H)Poly(U) mit hoher Spezifität und Sensitivität quantifiziert wurde. Interessanterweise ist diese Abnahme des mRNA-Gehaltes in beiden Versuchsreihen um annähernd den gleichen Betrag (20-25%) dokumentierbar und damit ebenfalls Temperatur-unabhängig.

Die qualitative, funktionelle Integrität der isolierten mRNA wurde durch in vitro-Translation nachgewiesen; hier zeigte sich - parallel zur Verminderung der Konzentration an myokardialer mRNA - ein koinzidenter, deutlicher Abfall der Translationsaktivität; wiederum verläuft die Kinetik beider Versuchsreihen (0°C/RT) in einem ersten Zeitintervall von 0 min bis 60 min post mortem konkordant: die Translationsaktivität der mRNA aus bei RT gelagertem Gewebe nimmt ebenso wie in der 0°C-Versuchsreihe um ca. 20% des Ausgangswertes ab, wobei bereits in den ersten 10 min postmortal der wesentliche Abfall der Proteinsynthese-Aktivität von 15% eintritt. Der Verlust an funktioneller Integrität der isolierten mRNA korrespondiert also zahlenmäßig der quantitativen Abnahme des mRNA-Gehaltes.

Bei der Auftragung der neu synthetisierten Proteine auf Gele zu ihrer Identifizierung zeigte sich, daß in beiden Versuchsreihen die extrahierbare mRNA stets für das grundsätzlich gleiche Muster myokardialer Proteine kodiert; die verminderte Translations-Aktivität 4 h postmortal wird durch eine feine Abschwächung der Banden im Vergleich zu den Auftragungen der frühen Werte dokumentiert.

Die Länge der Poly(A)-Sequenz, die das 3'-Ende einer jeden mRNA terminiert und als Parameter der Sequenzlänge der extrahierten mRNA gelten kann, lag in beiden Versuchsreihen im Bereich des Poly(A)₁₅₄-Markers. Bei RT zerfielen die Poly(A)-Sequenzen jedoch rasch innerhalb von 2-4 h postmortal auf eine Sequenzlänge von etwa 95 Nukleotiden, während die aus gekühltem Gewebe isolierten Poly(A)-Nuklidketten zu diesem frühen Zeitpunkt (2-4 h postmortal) eine größere Stabilität erwarten lassen; hier lagen die Meßwerte erst nach 24 h im Bereich der 95-Nuklid-Sequenz.

Bei Zusammenfassung der bisher erörterten Ergebnisse zeigt sich in einem frühen Zeitintervall post mortem (0 min - 2 h) eine offenbar von der Umgebungstemperatur unabhängige Kinetik der myokardialen Proteinsynthese, die bedingt wird durch molekularbiologisch erfaßbare Veränderungen der Genexpression im Herzmuskel, welche zu einer unspezifischen Degradation der an der Synthese myokardialer Proteine maßgeblich beteiligten mRNA-Sequenzen führen.

Interessanterweise kommt es hier zu keinem Abfall der myokardialen Gesamt-RNS-Konzentration, jedoch selektiv zu einer deutlichen Abnahme des myokardialen mRNA-Gehaltes um etwa 20-25%. Analog zu dieser Degradation funktionsfähiger mRNA sinkt die Proteinsynthese-Aktivität im *in vitro*-Assay ebenfalls um etwa 20%, wobei sich das Muster der neu synthetisierten Proteine abschwächt, aber nicht grundsätzlich ändert.

Ein weiterer die Degradation myokardialer mRNA unterstreichender Befund ist der rasche Zerfall langkettiger Poly(A)-Sequenzen, der sich innerhalb von 2-4 h postmortal durch abnehmendes Molekulargewicht bei zunehmender Lauflänge auf dem Gel manifestiert.

Ein deutlicher Unterschied im Gehalt myokardialer Gesamt-RNS in beiden Versuchsreihen (0°C/RT) zeigt sich erst nach mehr als 2 h post mortem: während bei 0°C bis zu 8 h nach Eintritt des Todes keinerlei Abfall des myokardialen Gesamt-RNS-Gehaltes gegenüber dem Ausgangswert zu dokumen-

tieren ist, zeichnet sich bei RT eine drastische Verminderung der Gesamt-RNS-Konzentration um 30% bereits innerhalb von 2-4 h ab. Diese ausgeprägte Degradation aller RNS-Sequenzen bei RT setzt sich in den folgenden Zeitintervallen fort und nach mehr als 48 h postmortal war hier myokardiale Gesamt-RNS nicht mehr zu quantifizieren.

Im gekühlten Herzmuskelgewebe kam es dagegen erst nach 8 h post mortem zu einer signifikanten, aber nur milde verlaufenden Abnahme der Gesamt-RNS (24 h pm: minus 10%) und erst zwischen 24 und 48 h läßt sich eine deutliche Degradation myokardialer Gesamt-RNS-Sequenzen auf etwa 50% des Ausgangswertes verzeichnen. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu keinem fortschreitenden Verlust an Gesamt-RNS mehr, deren Konzentration sich plateauförmig bei etwa 50% des Ausgangswertes erhält, sodaß die 0°C-Versuchsreihe zu diesem Zeitpunkt (120 h pm) beendet wurde.

Bei RT fällt mit der Abnahme der myokardialen Gesamt-RNS-Konzentration um etwa 50% der mRNS-Gehalt im gleichen Zeitraum (0 min - 8 h pm) weiter drastisch ab auf etwa 30% des Ausgangswertes, um nach 48 h post mortem unter die Nachweisgrenze zu sinken. Diese erhebliche Degradation der mRNS bei Raumtemperatur drückt sich in einer weiteren Abnahme der in vitro-Translations-Kapazität aus, die nach 24 h bis zum Leerwert abgesunken ist. Analog dazu kommt es zu einer deutlichen Abschwächung in der Fluorographie der synthetisierten Proteine bei unspezifischer Verminderung aller Proteine ohne Änderung ihres grundsätzlichen Verteilungsmusters.

Schließlich wird der rasche Zerfall komplexer, langkettiger mRNS-Sequenzen dokumentiert durch die Degradation der endständigen Poly(A)-Sequenzen, die bei Raumtemperatur von ursprünglich etwa 154 Adenin-Nukleotiden rasch zu kurzkettigen Poly(A)- und damit auch mRNS-Sequenzen abgebaut werden. Neben der qualitativen Verminderung komplexer Sequenzen zu kürzerkettigen Abbauprodukten wird die quantitative Abnahme des mRNS-Gehaltes ebenfalls belegt durch die verminderte Hybrid-Bildung der isolierten Poly(A)-Sequenzen mit (^3H)Poly(U).

Im gekühlten Myokardgewebe erreichte die Gesamt-RNS-Konzentration nach 24-48 h post mortem ein Plateau von etwa 50% des Ausgangswertes, das auch 120 h pm noch nachgewiesen werden konnte. Der mRNS-Gehalt als sehr empfindlicher Parameter hatte dagegen relativ stärker abgenommen und lag bei Abbruch der Versuchsreihe bei etwa 30%.

Analog dazu war die Translationsaktivität der isolierten mRNS-Präparationen auch zu Beendigung des Zeitversuches noch nicht auf den Leerwert abgesunken und die isolierten Poly(A)-Sequenzen, deren Nukleotidketten langsamer abgebaut wurden, zeigten bei Eistemperatur eine deutlich höhere Quantität und Stabilität, ablesbar an der Anzahl (^3H)-markierter Hybride.

In der Literatur über postmortale Veränderungen dominieren Untersuchungen des zentralen Nervensystemes, vor allem Arbeiten über Verteilung und Kinetik der Neurotransmitter; während kaum Studien über den Muskelstoffwechsel post mortem existieren.

Bisher gab es keine Untersuchung über den Myokardstoffwechsel nach dem Tode im allgemeinen, sowie insbesondere keine Arbeit, die die Zeitkinetik der Syntheseleistungen des Myokards - oder anderer Organe - molekularbiologisch qualitativ und quantitativ analysierte.

Marotta et al. berichteten 1980 in Zusammenarbeit mit Gilbert et al. über die erfolgreiche Isolierung intakter mRNS aus menschlichem Hirngewebe unmittelbar postmortal, die zur in vitro-Neusynthese der gehirnspezifischen Proteine fähig war. In diesen Arbeiten, die auf den grundsätzlich gleichen Methoden basieren, wie die von Zähringer zur Anwendung am Myokard modifizierten und auch in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bedingungen, wird ebenfalls über eine gute biologische Aktivität der postmortal extrahierten mRNS sowie über eine unspezifische Degradation aller mRNS-Sequenzen berichtet.

Die Studien der Arbeitsgruppe von Zähringer et al. (1981) über die Stabilität myokardialer RNS-Sequenzen nach 24 h pm in gekühltem bzw. raumtemperiertem Medium zeigten bei 0°C unverändert hohe Ausbeuten myokardialer Polyribosomen, bei RT jedoch Verluste in einer Höhe von 70%.

1.7. Zusammenfassung

Die Kinetik der myokardialen Proteinsynthese als Parameter der Veränderungen der Genexpression im Herzmuskel post mortem war im vorangegangenen Abschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht worden.

Dabei standen die Isolierung und Charakterisierung der mRNA als einem sehr wichtigen, die Proteinsyntheserate limitierenden und zugleich gegenüber Beeinflussungen der myokardialen Funktionslage äußerst empfindlichen Parameter im Vordergrund.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- 1) In einem frühen Zeitintervall von 0 min - 2 h pm läßt sich kein signifikanter Unterschied zwischen 0°C und RT feststellen; die Veränderungen der myokardialen Genexpression sind in diesem Zeitraum Temperatur-unabhängig:

Die Menge an myokardialer Gesamt-RNS bleibt konstant, dagegen kommt es selektiv in der mRNA-Fraktion zu einer deutlichen Abnahme von 20-25% und parallel dazu zur Verminderung der Translations-Aktivität um etwa 20%, sowie zur qualitativen und quantitativen Degradation der terminalen Poly(A)-Sequenzen.

Der Zerfall der mRNA ist jedoch nicht selektiv, sondern unspezifisch; das Muster der in vitro synthetisierten Proteine verändert sich nicht, sondern wird abgeschwächt.

- 2) Im weiteren Verlauf (ab 2 h pm) kommt es jedoch zu einer ausgeprägten, Temperatur-abhängigen Differenz in der Kinetik der myokardialen Proteinsyntheserate beider Versuchsreihen:

Bei 0°C liegt die Ausbeute an Gesamt-RNS sowie mRNA je Zeitintervall post mortem deutlich höher als bei Raumtemperatur, dabei zeigt sich auch nach 120 h pm noch eine gute Translations-Aktivität und Stabilität der Nukleotid-Sequenzen im gekühlten Gewebe; qualitative Unterschiede im Protein-Muster der codierenden mRNA-Sequenzen beider Versuchsreihen lassen sich jedoch zu keinem Zeitpunkt nachweisen.

Die Isolierung und Charakterisierung myokardialer mRNA als äußerst sensitivem Parameter zur Erfassung veränderter Funktionslagen des Herzmuskels erlaubt ein besseres Verständnis der grundlegenden Mechanismen von Genexpression und Proteinsynthese im Myokard.

In der Literatur über postmortale Veränderungen gab es bisher keine Untersuchung über den Myokardstoffwechsel im allgemeinen, sowie insbesondere keine Arbeit, die die Zeitkinetik der Syntheseleistungen des Herzmuskels - oder anderer Organe - molekularbiologisch quantitativ und qualitativ analysierte.

Dabei erscheint die biochemische Analyse postmortalen Herzmuskelgewebes, die möglich wird durch die beschriebenen Techniken der Isolierung biologisch aktiver mRNA-Sequenzen viele Stunden post mortem, von großer Bedeutung für die analysierende Untersuchung myokardialer Erkrankungen und sollte im Sinne der Grundlagenforschung auf postmortales menschliches Myokard übertragen werden, um später als diagnostische Möglichkeit bei Herzmuskelbiopsien anwendbar zu sein, zumal hier adäquate Tiermodelle fehlen.

Weiteranwendung der beschriebenen Methoden und fortgesetzte Studien sind geboten, um neue Einsichten in die biochemischen Prozesse der Genese und Progredienz myokardialer Erkrankungen zu vertiefen. Neben den Myokarditiden bieten sich hier wohl insbesondere die Kardiomyopathien unterschiedlicher Ätiologie und klinischer Manifestationsform als hochinteressantes Studienobjekt an zur Erforschung der dem Krankheitsbild auf genetisch-biochemischer Ebene zugrunde liegenden Veränderungen.

Die Möglichkeit, intakte und biologisch aktive mRNA aus postmortalem oder intraoperativ gewonnenem Gewebe zu isolieren und ihre Gewebskonzentration sowie das Muster der spezifisch synthetisierten Proteine in Hinblick auf das Krankheitsgeschehen zu analysieren, wird bislang jedoch bei weitem nicht ausgeschöpft.

2. Veränderung der myokardialen Genexpression bei Herzmuskelhypertrophie-Regression unter Nifedipin-Therapie

Klinische und tierexperimentelle Studien der letzten Jahre zeigen bei arterieller Hypertonie und Herzmuskelhypertrophie im allgemeinen eine gute Korrelation zwischen medikamentöser Blutdrucksenkung und der Rückbildung der Linksherzhypertrophie. Dies gilt jedoch wie unter 1.4.2. bereits ausführlich dargestellt, nicht für alle Antihypertensiva in gleichem Ausmaß.

Der folgende Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung von Veränderungen wichtiger Parameter der myokardialen Genexpression und Proteinsynthese während der Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie unter antihypertensiver Therapie mit Nifedipin.

Zur Erfassung der zu erwartenden Veränderungen und ihrer zugrunde liegenden Mechanismen dienten folgende Untersuchungen:

- 1) Isolierung myokardialer mRNA in der Gesamt-RNS-Fraktion aus Herzmuskelbiopsien
- 2) Quantifizierung der mRNA durch Hybridisierung an (^3H)Poly(U)
- 3) Bestimmung der DNS-/Gesamt-RNS-Konzentrationen sowie des myokardialen Proteingehaltes
- 4) Erfassung verschiedener Parameter, wie etwa des systolischen Blutdruckes und des linksventrikulären Herzgewichtes

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen der mit Nifedipin in einer Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht/Tag behandelten spontan hypertensiven Ratten (SHR) sowie der unbehandelten SHR und der normotensiven WKY-Kontrollen werden im folgenden dargestellt.

2.1. Veränderung des systolischen Blutdruckes sowie des linksventrikulären Herzgewichtes unter Nifedipin-Therapie

Unter der 20-wöchigen Nifedipin-Therapie nahm der systolische Blutdruckwert der behandelten SHR im Vergleich zu den unbehandelten spontan hypertensiven Tieren deutlich ab. Abbildung 12 zeigt diese Veränderung des Blutdruckes unter Therapie:

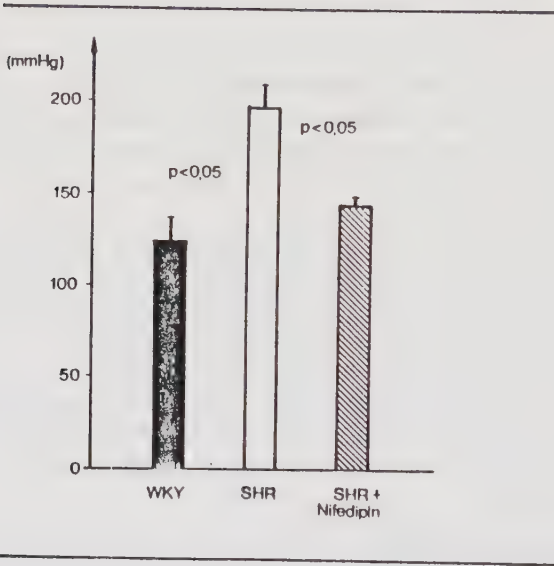


Abbildung 12: Veränderung des systolischen Blutdruckwertes unter chronischer Nifedipin-Therapie:

Im Vergleich zum unbehandelten SHR-Kollektiv (194 ± 12 mmHg) zeigte sich bei den Nifedipin-behandelten SHR (143 ± 12 mmHg) eine deutliche Angleichung an die Werte der normotensiven Kontrollgruppe WKY (121 ± 12 mmHg)

Dargestellt sind jeweils die gemittelten Werte der 40 Wochen alten Kollektive ($\pm$ SD) nach 20-wöchiger Nifedipin-Therapie (30 mg/kg/Tag).

Der im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen (121 ± 12 mmHg) wesentlich höhere systolische Wert unbehandelter SHR (194 ± 12 mmHg) wurde durch die 20-wöchige Gabe von Nifedipin normalisiert (143 ± 6 mmHg). Ebenso signifikant veränderte sich das linksventrikuläre Herzgewicht der behandelten Tiere (Abb. 13):

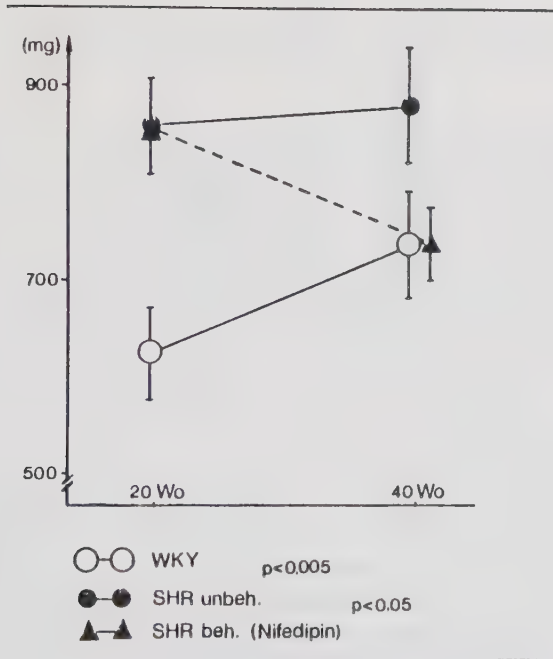


Abbildung 13: Veränderung des LV-Gewichtes unter Nifedipin-Therapie

Während es bei den normotensiven WKY-Kontrolltieren in dem 20-wöchigen Beobachtungszeitraum zu einer physiologischen Steigerung des LV-Gewichtes von 631 ± 35 mg auf 738 ± 58 mg kam, lag das Herzgewicht der unbehandelten SHR bei allen Messungen deutlich höher:

SHR (20 Wochen): 857 ± 114 mg; SHR (40 Wochen): 881 ± 62 mg; das Gewicht normalisierte sich jedoch unter der Nifedipin-Gabe auf 742 ± 41 mg, ebenso wie die Relation des linksventrikulären Herzgewichtes bezogen auf 100 g Körpergewicht, die bei unbehandelten SHR signifikant höher war ($0,23 \pm 0,01$) als bei den normotensiven WKY ($0,19 \pm 0,01$). Parallel zu diesen therapie-induzierten Veränderungen von Blutdruck und LV-Gewicht fanden sich - wie im folgenden Abschnitt beschrieben - erhebliche Veränderungen der myokardialen Genexpression.

2.2. Isolierung myokardialer mRNS und Quantifizierung im Hybridisierungs-Assay an (^3H)Poly(U)

Die mRNS als Anteil der Gesamt-RNS-Präparation wurde, wie in Abschnitt II.2.3. beschrieben, aus den homogenisierten Herzmuskelbiopsien isoliert. Je Herz wurden dabei 4 Biopsien aus dem tiefgefrorenen linken Ventrikel entnommen, abgewogen und sofort wieder bei -40°C eingefroren, bis die Aufarbeitung aller Biopsien zeitgleich und unter identischen Bedingungen erfolgen konnte. Die mRNS-Konzentration des linken Ventrikels wurde durch Hybridisierung der terminalen Poly(A)-Sequenz der mRNS an (^3H)Poly(U) bestimmt.

Abbildung 14 zeigt graphisch die Veränderung der mRNS-Konzentration unter Nifedipin-Therapie.

In den LV-Biopsien der spontan hypertensiven Tiere fand sich eine wesentlich höhere mRNS-Konzentration (85 ± 4 ug/g) als bei den gleichalten normotensiven Kontrollen (23 ± 2 ug/g). Dieser ausgeprägte Unterschied im Gehalt myokardialer mRNS-Sequenzen muß - im Hinblick auf die Bedeutung der mRNS als wichtigem, die Proteinsyntheserate limitierendem Parameter der myokardialen Genexpression - als Ausdruck einer deutlich erhöhten Genexpressionsrate im hypertrophierten Myokard der SHR gegenüber der physiologischen Situation bei WKY gewertet werden. Unter der 20-wöchigen Nifedipin-Gabe kam es jedoch zu einem deutlichen Abfall des LV-mRNS-Gehaltes (von 58 ± 4 ug/g auf 39 ± 2 ug/g Herz)

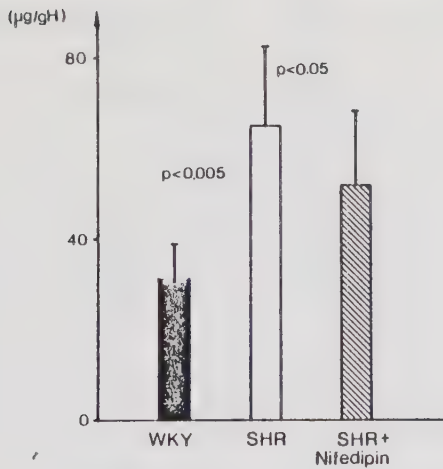


Abbildung 14: Veränderung der mRNA-Konzentration unter Nifedipin

Unter Therapie kam es zu einem deutlichen Abfall der LV-mRNA-Konzentration (von 58 µg/g bei unbehandelten SHR auf 39 µg/g bei behandelten SHR) entsprechend einer Normalisierung auf Werte der normotensiven WKY-Kontrolle (23 µg/g Herz).

in Richtung einer Normalisierung des Wertes auf das Niveau der normotensiven Kontrollen (23 ± 2 ug/g Herz).

Mit anderen Worten konnte bei dem therapierten Kollektiv der SHR-Gruppe neben der effektiven Blutdruckeinstellung die Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie weitgehend verhindert werden, wobei der Beeinflussung der myokardialen Genexpression und Proteinsyntheserate - ausgedrückt in der quantifizierbaren mRNA-Konzentration - die entscheidende Rolle zukommt.

2.3. Veränderung der myokardialen Protein-/DNS-/RNS-Konzentrationen

Die myokardiale Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Lowry mit Rinder-Serumalbumin-Standard bestimmt.

Erwartungsgemäß zeigte sich im hypertrophierten Herzmuskelgewebe der unbehandelten SHR eine gegenüber den normotensiven WKY nicht signifikant veränderte Proteinkonzentration (WKY: 225 ± 27 mg/g; unbehandelte SHR: 225 ± 39 ug/g; Nifedipin-behandelte SHR: 220 ± 51 ug/g Herz).

Nach Meerson (1975) pendelt sich die initial bei experimentell erzeugter akuter LV-Belastung stark erhöhte Proteinsyntheserate im Stadium relativ stabiler Herzmuskelhypertrophie, die dem beschriebenen Tiermodell der SHR zugrunde liegt, auf einem Niveau ein, das bezogen auf das vermehrte Herzgewicht zu einer normalen Proteinkonzentration im Myokard führt.

Abbildung 15 zeigt neben der Proteinkonzentration auch die Veränderungen der myokardialen DNS- und RNS-Konzentrationen, quantifiziert nach Munro und Fleck, während der Nifedipin-Therapie.

Sowohl die DNS- als auch die RNS-Konzentration war bei unbehandelten SHR mit 10-15% deutlich höher, als bei den normotensiven Kontrollen; unter Nifedipin-Gabe kam es zu einer Normalisierung beider Parameter; die DNS-Konzentration der unbehandelten SHR lag bei 0,93 mg/g; unter kam es zu einer Abnahme auf 0,81 mg/g, die WKY-Kontrollen lagen bei 0,83 mg/g Herz. Gesamt-RNS der unbehandelten SHR: 1,92 mg/g; unter Therapie Abfall auf 1,74 mg/g, WKY-Werte bei 1,70 mg/g Herz.

Die myokardiale DNS-Konzentration ist als das biochemische Korrelat der Kollagensynthese und Bindegewebsproliferation im Herzmuskel zu betrachten, da die Myozyten des erwachsenen Tieres amitotisch sind.

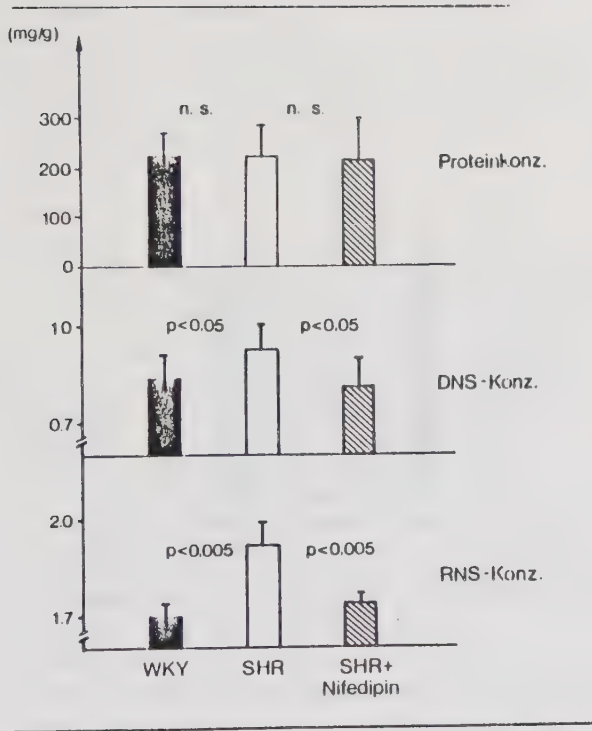


Abbildung 15: Veränderung der myokardialen Proteinkonzentration sowie des DNS- und RNS-Gehaltes unter 20-wöchiger Nifedipin-Therapie
Erwartungsgemäß zeigt sich die Proteinkonzentration unverändert; die mit 10-15% signifikant erhöhten DNS- und RNS-Werte der unbehandelten SHR nehmen unter Therapie ab auf Werte der normotensiven WKY-Kontrollgruppe

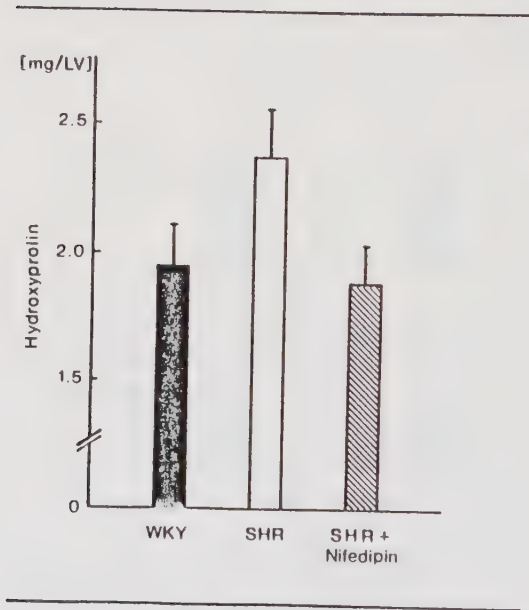


Abbildung 16: Veränderung des myokardialen Hydroxyprolin-Gehaltes unter Nifedipin-Therapie (nach Motz und Strauer, 1985)

Unter Nifedipin-Therapie geht die Abnahme der myokardialen DNS-Konzentration während der Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie mit der Verminderung des Kollagengehaltes einher, der in der Hydroxyprolin-Konzentration gemessen wird. Die Untersuchung dieses Parameters wurde 1985 von der Arbeitsgruppe Motz und Strauer aus aliquotiertem Herzmuskelgewebe dieser

Versuchsreihe parallel zu den beschriebenen Studien durchgeführt (siehe Abbildung 16). Eine zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse dieser Studie gibt Tabelle 6).

Eine Zusammenfassung und Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse und ihre kritische Erörterung anhand der bisher aus der Literatur bekannten biochemischen Befunde bei Herzmuskelhypertrophie-Regression soll in der folgenden Diskussion versucht werden.

2.3. Diskussion

Zahlreiche Arbeiten, die die biochemischen Veränderungen im hypertrophierenden Herzmuskel untersuchten, haben die enge Koppelung adaptiver Herzmuskelhypertrophie-Entstehung mit eingreifenden Veränderungen in die Regulation der myokardialen Proteinsynthese dokumentiert, wobei die Stimulation der RNS- und Proteinsyntheserate eine entscheidende Rolle spielt (Meerson 1975; Rabinowitz und Zak 1972 und 1975).

Die mRNS-Konzentration als ein die myokardiale Proteinsyntheserate limitierender Faktor wurde von Zähringer et al. 1984 im Modell der T_3 -induzierten Herzmuskelhypertrophie sowie in Herzmuskelbiopsien aus den hypertrophierten Herzen von Patienten mit Mitralvitien untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten legen nahe, daß ein gesteigerter mRNS-Gehalt Ausdruck einer direkten Stimulation der myokardialen Genexpression ist und - seinerseits die Proteinsyntheserate im Herzmuskel entscheidend beeinflussend - eine direkte Zunahme der myokardialen Proteinsynthese bewirkt.

Nicht eindeutig geklärt ist bisher die Frage nach dem primären Stimulus, der Veränderungen in der myokardialen Genexpression einleitet und damit die gesteigerte Proteinsynthese im Herzmuskel und letztlich die Entstehung der Herzmuskelhypertrophie initiiert.

In dieser Frage eröffnen insbesondere Untersuchungen von Hammond (1979) über die direkte Stimulation der myokardialen Proteinsynthese durch humorale Faktoren ("pressor substances"), die - unter den Bedingungen arterieller Hypertonie aus hypertrophiertem Herzmuskel- oder Nierengewebe extrahiert - am normal perfundierten Herzen die Proteinsynthese steigerten, neue interessante Aspekte über die biochemischen Regulationsmechanismen der Organadaptation.

Auch Gordon (1972), Szakacs (1960) und Suzuki (1975) demonstrierten in ihren Untersuchungen die Bedeutung adrenerger Faktoren bei der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie, indem sie zeigten, daß Angiotensin II und Katecholamine sowohl in Zellkulturen, als auch in nicht-Blutdruck-relevanter Dosierung im Organismus (also jeweils ohne hämodynamische Auswirkungen) eine deutliche Zunahme der myokardialen Proteinsynthese sowie die Entwicklung einer myozytären Hypertrophie bewirkten.

Erst in weiterführenden Studien zeigten sich Anhalte dafür, daß adrenerge Faktoren nicht nur bei der Entstehung, sondern auch bei der Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie von Bedeutung sein könnten:

Da als wichtigste Ursache für die Entstehung einer Herzmuskelhypertrophie die Erhöhung des arteriellen Blutdruckes seit langem bekannt war, lag es zunächst nahe, die Erwartungen einer therapeutischen Herzmuskelhypertrophie-Regression primär an die effektive Senkung des Blutdruckes zu knüpfen.

Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen demonstrierten bei medikamentöser Therapie der arteriellen Hypertonie im allgemeinen eine parallel zur Blutdruck-Normalisierung eintretende Regression der Herzmuskelhypertrophie.

Rasch zeigte sich jedoch, daß nicht in allen Studien und somit nicht für alle Antihypertensiva gleichermaßen eine direkte Kausalität zwischen der Rückbildung der Herzmuskelmasse und der effektiven Blutdruckeinstellung besteht:

Trotz ausgeprägter Blutdruck-Reduktion durch Nachlastsenker wie Hydralazin oder Diuretika konnte keine Regression der Herzmuskelhypertrophie verzeichnet werden (Masson 1958; Sen 1983; Limas 1980); unter Minoxidil kam es bei starker Blutdrucksenkung sogar zur Zunahme der Herzmuskelmasse (Rushkuaho 1984).

Alpha-Methyldopa verursachte auch ohne nennenswerte Blutdruck-Reduktion eine - in diesem Fall unerwünschte - deutliche Verminderung der Myokardmasse (Sen et al. 1977).

Die Calcium-Antagonisten Nifedipin, Nitrendipin und Felodipin führten dagegen neben einer deutlichen Blutdrucksenkung nahezu regelhaft zu einer ausgeprägten Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie; ebenso die ACE-Hemmer Captopril und Enalapril sowie β -Blocker (Strauer 1983; Kazda 1982; Lederle 1984; Nakashima 1984; Ibrahim 1981).

Die unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Pharmaka hinsichtlich des Ausmaßes der zu erreichenden Herzmuskelhypertrophie-Regression erklären Tarazi (1982) und Östman-Smith (1981) durch ihre unterschiedliche Beeinflussung sympathisch-adrenerger Stimuli, vor allem des Angiotensin II und der Katecholamine.

Untersuchungen von Sen et al. (1983) deuteten die ausgeprägte Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie durch das sympatholytisch wirksame Alpha-Methyldopa als drastische Reduktion des myokardialen Katecholamin-Gehaltes. Vasodilatoren und Nachlastsenker dagegen lassen trotz starker Blutdrucksenkung den Katecholamin-Haushalt im Herzen unbeeinflusst - sofern sie nicht sogar indirekt reaktiv-adrenerg stimulierend wirken - und initiieren somit auch keine Verminderung des Herzgewichtes.

Auch die Studien von Yamori (1980) über die durch β -Blocker induzierbare Abnahme der Herzmuskelmasse, die durch Alpha-Blocker trotz Blutdruckregulation nicht zu erreichen war, unterstreichen die Bedeutung des Angiotensin II- und Katecholamin-Haushaltes für die Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie; wobei postuliert worden war, daß der Effekt des myokardialen Katecholamingehaltes in einer Beeinflussung der myokardialen Genexpression und damit der Proteinsynthese im Herzmuskel besteht (Kairallah 1976).

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese mit den bereits beschriebenen Methoden der Isolierung und Charakterisierung myokardialer Gesamt-RNS und mRNS als wichtiger Parameter der Genexpression und Proteinsynthese im Herzmuskel während der Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie unter antihypertensiver Therapie mit Nifedipin näher untersucht werden.

Es zeigte sich, daß 20-wöchige Nifedipin-Therapie zu einer Normalisierung der Blutdruckwerte führt (von 194 mmHg bei unbehandelten SHR auf 143 mmHg bei behandelten Tieren) sowie zur Regression der Myokardhypertrophie des linken Ventrikels (unbehandelte SHR: 881 mg; behandelte SHR: 742 mg). Parallel zu diesen Veränderungen von systolischem Blutdruck und LV-Gewicht zeigten sich erhebliche Veränderungen der die myokardiale Genexpression bedingenden Parameter:

In den linksventrikulären Herzmuskelbiopsien der unbehandelten SHR fanden sich wesentlich höhere mRNS-Konzentrationen als bei den normotensiven WKY-Kontrollen (SHR: 66 mg/g; WKY: 31 mg/g).

Dies muß als Ausdruck einer deutlich gesteigerten myokardialen Genexpressions-Rate im hypertrophierten Herzen gewertet werden, da der mRNS-Gehalt geschwindigkeits-begrenzend für die myokardiale Proteinsyntheserate ist. Unter der Nifedipin-Therapie kam es zu einem deutlichen Rückgang der linksventrikulären mRNS-Konzentration von 66 mg/g auf 52 mg/g. Diese Abnahme des mRNS-Gehaltes verursacht die mit der Herzmuskelhypertrophie-Regression einhergehende Reduktion der myokardialen Proteinsynthese; die Rate der Protein-Degradation bleibt unverändert oder nimmt ab, sodaß beim Rückgang der Herzmuskelmasse lediglich die Abnahme der Protein-Neusynthese eine entscheidende Rolle spielt (Sanford 1978).

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von Zähringer et al. (1984) über den mRNS-Gehalt im menschlichen Papillarmuskel bei Mitralvitien. Hier zeigte sich in den Biopsien aus operativ ersetzttem Papillarmuskelgewebe bei Patienten mit Mitralinsuffizienz und linksventrikulärer Hypertrophie ein signifikant höherer mRNS-Gehalt als bei Mitralstenose und Atrophie des linken Ventrikels. Nach Zähringer ergab eine retrospektive Analyse des postoperativen Verlaufs dieser Patienten weiterhin, daß Patienten mit günstigem postoperativem Verlauf einen deutlich höheren myokardialen mRNS-Gehalt aufwiesen, als Patienten, die postoperativ verstarben. Vom Autor werden diese Befunde dahingehend interpretiert, daß eine bei höherem mRNS-Gehalt erhöhte myokardiale Proteinsyntheserate für die postoperativ erforderliche Anpassung der myokardialen Pumpfunktion an die veränderte hämodynamische Situation von Vorteil sein könnte (Zähringer 1985).

Als weiteres Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen zeigte sich eine unveränderte Gesamt-Proteinkonzentration bei behandelten sowie unbehandelten SHR und Kontrolltieren; wie Meerson 1975 zeigen konnte, stellt sich die Proteinsyntheserate im Stadium stabiler Herzmuskelhypertrophie auf ein Niveau ein, das bezogen auf das vermehrte Herzgewicht zu unverändert normaler Proteinkonzentration im Myokard führt.

Die DNS- und Gesamt-RNS-Konzentrationen, die bei unbehandelten SHR mit 10-15% deutlich höher lagen als bei den WKY-Kontrollen, nahmen unter der Nifedipin-Therapie auf die Werte der Kontrollgruppe ab.

Dies ist insbesondere in Hinblick auf den myokardialen DNS-Gehalt als biochemisches Korrelat der Bindegewebs- und Kollagensynthese interessant.

Motz et al. (1985) konnten im Herzmuskel der Nifedipin-behandelten Tiere deutlich verminderte Kollagenkonzentrationen, gemessen am myokardialen Hydroxyprolin-Gehalt, nachweisen und zeigen, daß sich die während der Regression der Herzmuskelhypertrophie eintretende Abnahme des myokardialen Kollagengehaltes hämodynamisch günstig auswirkt: die Myokard-Dehnbarkeit ("myocardial stiffness") bleibt unbeeinflusst (Motz et al. 1985).

Dies steht in positivem Gegensatz zu den bisher bekannten Ergebnissen der Herzmuskelhypertrophie-Regression bei antihypertensiver Therapie, die eine unterschiedlich starke Abnahme der myokardialen Kollagensynthese im Vergleich zur Gesamt-Proteinsynthese zeigten und damit auch eine unterschiedliche myokardiale Kollagenkonzentration:

Während Alpha-Methyldopa und Hydralazin zu einer Zunahme der Kollagenkonzentration und damit auch der myokardialen Wandsteifigkeit führen und ACE-Hemmer keine Änderung bewirken (Sen 1983), initiierte Nifedipin eine deutliche Abnahme der Kollagenkonzentration im Herzmuskel um etwa 18%.

In der antihypertensiven Langzeitbehandlung mit Calcium-Antagonisten zeigt sich somit neben der ausgeprägten Rückbildung einer bestandenen Herzmuskelhypertrophie bei gleichzeitiger effektiver Blutdrucksenkung ein günstiger hämodynamischer Effekt: durch die Therapie-induzierte Abnahme der myokardialen Kollagenkonzentration kommt es zu keiner Beeinträchtigung der Dehnbarkeit und damit der Pumpleistung des Herzmuskels.

Ausgehend von der Diskussion der bisher erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Effektes antihypertensiver Medikation auf Blutdrucksenkung und Herzmuskelhypertrophie-Regression und anhand einer Analyse der vorliegenden biochemischen Veränderungen, die bei der Rückbildung einer Herzmuskelhypertrophie von Bedeutung sind, postuliert Zähringer die bereits erwähnte biochemische Reaktionskette bei der Regression der Herzmuskelhypertrophie (Abbildung 2). Hier wurden die aus der Literatur sowie aus Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bekannten Befunde in Form einer Reaktionssequenz integriert, die zu einem biochemisch begründeten Verständnis der divergierenden Wirkungen verschiedener Antihypertensiva auf Blutdruck-Reduktion und Herzmuskelhypertrophie-Regression führt: Die effektive medikamentöse Intervention gelingt dabei über die Beeinflussung des Angiotensin II und/oder des myokardialen Katecholamin-Haushaltes, um über eine Verminderung des Polyamin-Gehaltes und damit

auch der mRNS-Konzentration in der Myokardzelle die Proteinsynthese zu verringern und damit letztlich die Regression der Herzmuskelhypertrophie einzuleiten.

Die Bedeutung der Angiotensin II- und Katecholamin-Spiegel erwies sich in verschiedenen eingangs bereits erwähnten Studien und experimentellen Modellen:

Mit der Beeinflussung adrenerger Faktoren, etwa durch β -Blocker (Yamori 1980), wurde auch in nicht-Blutdruck-relevanter Dosierung eine starke Senkung der myokardialen Proteinsyntheserate und damit eine deutliche Beeinflussung der Genexpression im Herzmuskel bewirkt, während Vasodilatoren trotz ausgeprägter Blutdrucksenkung kaum Einfluß auf den Stoffwechsel der Myokardstrukturen zeigten.

Es bleibt offen, ob die verschiedenen Pharmaka neben der Einflußnahme auf die erwähnten adrenergen Faktoren und damit des Startes der postulierten biochemischen Reaktionssequenz einen zusätzlichen - direkten oder indirekten - Einfluß auf die genetische Information der Zelle und damit auf die Synthese myokardialer Proteine nehmen.

Diese Möglichkeit einer direkten stimulierenden oder hemmenden Auswirkung erhöhter oder verminderter Katecholamin- oder Angiotensin II-Spiegel auf den genetischen Code der Zelle bzw. einzelne Faktoren, die die myokardiale Genexpression wesentlich bedingen, ist durchaus denkbar; etwa analog des von Zähringer beschriebenen Einflusses von Thyroxin und Trijodthyronin oder anderer Hormone auf die Translations- oder Transkriptionsphase der myokardialen Genexpression.

(Übersicht bei Zähringer, 1984)

Tabelle 6: Wirkung chronischer Nifedipin-Behandlung auf verschiedene biochemische Parameter:

Parameter	WKY	SHR
	40 Wochen	40 Wochen + Nifedipin
RR (mmHg)	121 ± 12	143 ± 6
Körpergewicht (g)	399 ± 17	357 ± 22
Herzgewicht (mg)	975 ± 91	953 ± 64
LV-Gewicht (mg)	738 ± 58	742 ± 41
Proteinkonz. (mg/g Herz)	225 ± 27	220 ± 51
Hydroxyprolin-Konz. (mg/g)	2.26 ± 0,18	1,98 ± 0,15
Hydroxyprolin-Konz. (mg/g LV)	2,78 ± 0,22	2,66 ± 0,21
DNS-Konz. (mg/g Herz)	0,83 ± 0,08	0,81 ± 0,15
Gesamt-RNS-Konz. (mg/g)	1,70 ± 0,04	1,74 ± 0,03
mRNS-Konz. (ug/g Herz)	31 ± 8	52 ± 17
mRNS-Konz./LV (ug/g)	23 ± 2	39 ± 2

(nach Zähringer und Danninger, 1985; Motz und Strauer 1985)

2.4. Zusammenfassung

Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, daß bei arterieller Hypertonie und Linksherzhypertrophie eine medikamentös erreichte Blutdrucksenkung im allgemeinen zur Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie führt.

Wie bereits dargelegt, gilt dies nicht für alle Antihypertensiva gleichermaßen; zum Teil läßt sich sogar eine außerordentliche Dissotiation zwischen Blutdruck-Beeinflussung und Induktion einer Herzmuskelhypertrophie-Regression beobachten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Dokumentation des Stellenwertes der Calcium-Antagonisten, hier des Nifedipin, bezüglich der Rückbildung einer Herzmuskelhypertrophie bei arterieller Hypertonie.

Dabei standen Untersuchungen über die Veränderungen der Herzmuskelmasse und deren biochemisches Korrelat, die Genexpression und Proteinsynthese in der Myokardzelle, im Vordergrund.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- 1) Chronische Nifedipin-Therapie führt zu einer deutlichen Blutdrucksenkung; konsekutiv kommt es bei abnehmendem LV-Gewicht zur Regression der Herzmuskelhypertrophie.
- 2) Veränderungen der myokardialen Genexpression, die mit hoher Sensitivität über Veränderungen des mRNA-Gehaltes erfaßbar sind, wurden als wesentliche Faktoren bei der Entstehung und bei der Rückbildung der Hypertrophie des Herzens identifiziert.

Dabei erfolgt die Beeinflussung der myokardialen Genexpression vermutlich über die Interaktion adrenerger Faktoren (Angiotensin II / Katecholamine) und führt neben einer Abnahme der Gesamt-RNS-Sequenzen über die Verminderung des mRNA-Pools zur Drosselung der Proteinsyntheserate im Myokard.

Die relative Proteinkonzentration bleibt dabei unverändert.

- 3) Unter Nifedipin-Therapie nahm die myokardiale Kollagenkonzentration, erfaßbar im DNS- bzw. Hydroxyprolin-Gehalt, deutlich ab; dies ist in Hinblick auf die Wandsteifigkeit des Myokards und die linksventri-

kuläre Pumpfunktion als günstiger Befund zu werten.

Vergleichbar gute Ergebnisse hinsichtlich Blutdrucksenkung und Rückbildung der Herzmuskelhypertrophie liegen in der Literatur für Nitrendipin und Felodipin vor.

Calcium-Antagonisten sind somit bei der Therapie hypertensiver Patienten mit Herzmuskelhypertrophie den Vasodilatoren und den Diuretika, aber auch dem Alpha-Methyldopa eindeutig vorzuziehen.

Danksagungen:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr.med. J. Zähringer für die großzügig bereitgestellten Möglichkeiten zu eigenverantwortlichem Arbeiten sowie für eine ausgezeichnete Betreuung, die jederzeit Fragen und anregende Diskussionen ermöglichte.

An dieser Stelle sei auch allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für ihre Hilfe und Mitarbeit herzlich gedankt:

Frau Helena Becker, Frau Gudrun Stüb und Herr Wilfried Aschauer.

Besonders dankend hervorheben möchte ich die stete Hilfsbereitschaft von Frau Elisabeth Stangl, unter deren wissenschaftlicher und technischer Anleitung sich die Einarbeitung in die Methodik ebenso effektiv wie harmonisch gestaltete.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- Abelson J (1979) RNA processing and the intervening sequence problem. *Annu Rev Biochem* 48:1035-1069
- Adler C, Sandritter W, (1980) Alterations of substances (DNA, myoglobin, protein) in experimentally induced cardiac hypertrophy and under the influence of drugs (isoproterenol, cytostatics, strophantin). *Basic Res Cardiol* 75:126-138
- Anversa P, Olivetti G, Melissari M, Loud A, (1980) Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat. *J Mol Cell Cardiol* 12:781-795
- Atkins F, Carney R, Love S, (1983) Regression of thyroid hormone induced cardiac hypertrophy: effect on cardiac beta receptors and adenyl cyclase activity. *Life Sci* 33:679-685
- Aviv H, Leder P, (1972) Purification of biologically active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Nat Acad Sci USA* 69:1408-1412
- Ayobe H, Tarazi R, (1984) Reversal of changes in myocardial β -receptors and inotropic responsiveness with regression of cardiac hypertrophy in renal hypertensive rats (RIIR). *Circ Res* 54:125-133
- Bishop J, Rosbash M, Evans D, (1974) Polynucleotide sequences in eukaryotic DNA and RNA that form Ribonuclease-resistant complexes with polyuridylic acid. *J Mol Biol* 85:75-86
- Bonner W, Laskey R, (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 46:83-88
- Brawerman G, (1974) Eukaryotic messenger RNA. *Annu Rev Biochem* 43:621-642
- Caldarera C, Casti A, Rossoni C, (1971) Polyamines and noradrenaline following myocardial hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 3:121-126
- Caldarera C, Orlandini G, Casti A, (1974) Polyamine and nucleic acid metabolism in myocardial hypertrophy of the overloaded heart. *J Mol Cell Cardiol* 6:95-103
- Carey R, Bove A, Coulson R, Spann J (1978) Recovery of myosin ATPase after relief of pressure-overloaded hypertrophy and failure. *Am J Physiol* 234(6):711-717
- Chambon P, (1975) Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 44:613-638

- Civelli O, Vincent A, Maundrell K, Buri J, Scherrer K, (1980) The translational repression of globin mRNA in free cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Eur J Biochem* 107:577-585
- Cuttilletta A, (1980) Regression of myocardial hypertrophy.II.RNA synthesis and RNA polymerase activity. *J Mol Cell Cardiol* 12:827-832
- Danninger B, Stangl E, Aschauer W, Motz W, Strauer B, Zähringer J, (1985) Herzmuskelhypertrophie-Regression und Veränderung der myokardialen Genexpression unter Nifedipin-Gabe. *Z Kardiol* 74:Supp 3,62
- Darnell S, (1976) mRNA structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 19:493-511
- Devereux R, Savage D, Sachs I, Laragh J, (1980) Effect of blood pressure control on left ventricular hypertrophy and function in hypertension. *Circulation* 62,SuppIII:36
- Dillmann W, (1981) Influence of thyroid hormones on cardiac mRNA levels. *Endocrinology* 109,T-20
- Drayer J, Weber M, Gardin J, (1983) Mediators of changes in left ventricular mass during antihypertensive therapy. *Am J Cardiol* 53:98-105
- Dunn F, Oigman W, Ventura H, Messerli F, Kobrin J, Frohlich E, (1984) Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass on essential hypertension. *Am J Cardiol* 53:105-108
- Everett A, Chizzonite R, Clarc W, Zak R, (1983) Relationship of changes in molecular forms of myosin heavy chains to endogenous level of thyroid hormone during postnatal growth. *Persp Cardiovasc Res* Vol 8: 83-92
- Fouad F, Nakashima Y, Tarazi R, Salvedo E, (1982) Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients treated with methyldopa. *Am J Cardiol* 49:795-801
- Fouad F, Nakashima Y, Tarazi R, Bravo E, (1983) Left ventricular function with reversal of left ventrikular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Pharmacol Ther* 33:226
- Franze-Fernandez NT, Pogo AO, (1971) Regulation of the nuclear DNA-dependent RNA polymerase by amino acids in Ehrlich ascites tumor cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 68:3040-3044

- Frohlich E, (1983) Physiologic considerations in left ventricular hypertrophy. *Am J Med* 75:12-18
- Gibson K, Harris P, (1972) The effect of pulmonary constriction on myocardial aminoacyl-tRNA synthetase and transferring enzyme activity. *J Mol Cell Cardiol* 4:381-390
- Gibson K, Harris P, (1972) Effect of hypobaric oxygenation, hypertrophy and diet on some myocardial cytoplasmic factors concerned with protein synthesis. *J Mol Cell Cardiol* 4:651-660
- Gibson K, Harris P, (1973) The effects of diphtheria toxin on guinea pig myocardial protein synthesis. *J Mol Cell Cardiol* 5:185-190
- Gibson K, Harris P, (1976) The effects of polyamines on cardiac protein biosynthesis. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 7:71-76
- Gilbert J, Brown B, (1981) The preparation of biologically active mRNA from human postmortem brain tissue. *J Neurochem* 36:3 976-984
- Gillespie D, Marshall R, Gallo R, (1972) RNA of RNA tumor viruses contains poly(A). *Nature New Biol* 236:227-231
- Goldberg AL, (1971) A role of aminoacyl-tRNA in the regulation of protein in *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci USA* 68:362-366
- Gordon AL, Inchiosa MA, Lehr D, (1972) Isoproterenol-induced cardiomegaly: assessment of myocardial protein content, actomyosin ATPase and heart rate. *J Mol Cell Cardiol* 4:543-557
- Gudbjarnason S, Telerman M, Bing R, (1964) Protein metabolism in cardiac hypertrophy and heart failure. *Am J Physiol* 206:294-298
- Hammond G, Wieben E, Markert C, (1979) Molecular signals for initiating protein synthesis in organ hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2455-2459
- Heinrich P, Gross V, Northemann W, Scheurle N, (1978) Structure and function of nuclear ribonucleoprotein complexes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 81:102-134
- Hickson R, Galassi T, Dougherty K, (1983) Repeat development and regression of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 54:794-797
- Hjalmarson A, Rannels D, Kao R, Morgan H, (1975) Effects of hypophysectomy, growth hormone and thyroxine on protein turnover in heart. *J Biol Chem* 250:4556-4561

- Hort, W, (1981) Pathologische Anatomie der Herzmuskelhypertrophie und Herzinsuffizienz. *Herz Kreislauf* 4:81 153-157
- Ibrahim M, Madkour M, Mossalam R, (1981) Effect of beta blockade therapy on hypertensive cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol* 47:469
- Idiko H, Fernandez P, Triggle C, Kim B, (1983) Regression of left ventricular hypertrophy and control of hypertension in the spontaneously hypertensive rat (SHR): oxprenolol versus hydrochlorothiazide. *Clin Invest Med* 6:43-48
- Jacob F, Monod J, (1961) Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-356
- Jefferson L, Wolpert E, Giger K, Morgan H, (1971) Regulation of protein synthesis in heart muscle. *J Biol Chem* 246:2171-2178
- Jeffery W, Brawermann G, (1974) Characterization of the steady-state population of mRNA and its poly(adenylic acid) segment in mammalian cells. *Biochemistry* 13:4633-4637
- Kaufmann S, Gross K, (1974) Quantitation and size determination of poly (A) by hybridisation to (³H)poly(dt). *Biochem Biophys Acta* 353:133
- Kaul U, Mohan I, Bhatia M, (1984) Effects of labetalol on left ventricular mass and function in hypertension - an assessment by serial echocardiography. *Int J Cardiol* 5:461-469
- Kazda S, Garthoff B, Thomas G, (1982) Antihypertensive effekt of a calcium antagonistic drug: Regression of hypertensive cardiac hypertrophy by nifedipine. *Drug Developm Res* 2:313-323
- Kairallah P, Sen S, Tarazi R, (1976) Angiotensin, protein biosynthesis and cardiovascular hypertrophy. *Am J Cardiol* 37:148
- Kairallah P, Kanabus J, (1983) Angiotensin and myocardial protein synthesis. *Persp in Cardiovasc Res Vol* 8:337-347
- Kleitke B, Hinterberger U, Onnen K, Rabitzsch G, Wollenberger A, (1973) Der Einfluß von totaler Ischämie auf die Ribonukleinsäure- und Eiweißsynthese im Herzmuskel der Ratte, untersucht an Schnitten und zell-freien Systemen. *Acta Biol Med Ger* 30:33-55
- Klotz C, Leger J, Elzinga M, (1982) Comparative sequence of myosin light chains from normal and hypertrophied human hearts. *Circ Res* 50:201

- Kuwajima I, Kordon M, Pegram B, Frohlich E, (1982) Regression of left ventricular hypertrophy in two-kidney, one clip goldblatt hypertension. *Hypertension* 4, Supp II:113-118
- Lederle R, Klaus D, Tegenthoff M, (1984) Die Rückbildung der Linkshypertrophie unter Captopril bei Patienten mit Nierenarterienstenose *Z Kardiol* 74 Supp II:67
- Lewin B, (1980) *Gene expression 2* (second edition) Wiley-Interscience Publication New York
- Limas C, Spier S, (1980) Effect of antihypertensive therapy on calcium transport by cardiac sarcoplasmatic reticulum of SHR's. *Cardiovasc Res* 14:692-699
- Lodish H, Jacobsen M, (1972) Regulation of hemoglobin synthesis. *J Biol Chem* 247:3622-3629
- Lowry ON, Rosebrough N, Farr A, Randall R, (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lundin S, Hallböck-Nordjander M, (1984) Regression of structural cardiovascular changes by antihypertensive therapy in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 2:11-18
- Maizel J, (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Meth Virol* 5:179-246
- Mans R, Novelli G, (1961) Measurement of the incorporation of radioactive aminoacids into protein by a filter-paper disk method. *Arch Biophys* 94:48-53
- Marotta Ch, (1981) In vitro synthesis of human brain proteins including tubulin and actin by purified postmortem mRNA. *J Neurochemistry* 36: (3) 966-975
- Masson G, McCormack L, Dustan H, Corcoran R, (1958) Hypertensive vascular disease as a consequence of increased arterial pressure. Quantitative study in rats with hydralazine treated renal hypertension. *Am J Path* 34:817-833
- Matsushita S, Sogani R, Raben M, (1972) Ornithine decarboxylase in cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 31:699-709
- Meerson F, Pomoinitzky V, (1972) The role of high energy phosphate compounds in the development of cardiac hypertrophy. *J Moll Cell Cardiol* 4:571-597

- Meerson F, Javitz M, Breger A, Lerman M, (1974) The mechanism of the heart's adaptation to prolonged load and dynamics of RNA synthesis in the myocardium. *Basic Res Cardiol* 69:484-499
- Meerson F, (1975) Role of synthesis of nucleic acids and protein in adaptation to the external environment. *Phys Rev* 55:79-123
- Meerson F, Javich M, Podobed O, (1981) Metabolism of poly(A)-containing mRNA in myocardium under normal physiological conditions and compensatory cardiac hyperfunction. *Basic Res Cardiol* 76:124-135
- Mercadier J, Lompre A, Wisniewsky C, (1981) Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 49:525-532
- Morgan H, Earl D, Broadus A, Wolpert E, Jefferson L, (1971) Regulation of protein synthesis in heart muscle. I. Effect of amino acid levels on Protein synthesis. *J Biol Chem* 246:2152-2162
- Morgan H, Jefferson L, Wolpert E, Rannels D, (1971) Regulation of protein synthesis in heart muscle. II. Effect of amino acid levels and insulin on ribosomal aggregation. *J Biol Chem* 246:2163-2170
- Morgan H, Rannels D, Kao R, (1974) Factors controlling protein turnover in heart muscle. *Circ Res (Suppl III)* 34:22-31
- Motz W, Strauer B, (1983) Nifedipin in the long-term management of hypertensive heart disease. *Hypertension* 5, Suppl II:39-44
- Motz W, Zähringer J, Strauer B, (1985) Myokardialer Kollagengehalt und Dehnbarkeit nach Hypertrophie-Regression. *Z Kardiol* 4, Suppl 3, 61
- Munro H, Fleck A, (1966) The determination of nucleic acids. *Inter-science*, New York, London, *Methods of biochemical analysis* 14, 113.
- Nakashima Y, Fouad F, Tarazi R, (1984) Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by enalapril. *Am J Cardiol* 55:508-514
- Narayanan N, Eapen J, (1973) Cell free synthesis of myosin by cardiac muscle myofibrils. *Biochem Biophys Acta* 512:413-425
- Östman-Smith I, (1981) Cardiac sympathetic nerves as the final common pathway in the induction of adaptive cardiac hypertrophy. *Clin Sci* 61:265-272
- Palmiter R, (1973) Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation. *J Biol Chem* 248:2095-2106

- Palmiter R, (1975) Quantitation of parameters that determine the rate of ovalbumin synthesis. *Cell* 4:189-197
- Perlman S, Abelson H, Penman S, (1973) Mitochondrial protein synthesis: RNA with the properties of eukaryotic messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:350-353
- Perry R, (1976) Processing of RNA. *Annu Rev Biochem* 45:605-629
- Perin A, Sessa A, Desiderio M, (1983) Polyamine levels and diamine oxydase activity in hypertrophic heart of spontaneously hypertensive rats (SHR) *Am J Cardiol* 45:465
- Perloff J, (1982) Developpment and regression of increased ventricular mass. *Am J Cardiol Vol* 50:605-611
- Pinder J, Staynov D, Gratzner W, (1974) Electrophoresis of RNA in formamide. *Biochemistry* 13:5373-5378
- Pfeffer J, Pfeffer M, Mirsky J, Braunwald E, (1983) Prevention of the development of heart failure and the regression of cardiac hypertrophy by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Europ Heart J* 4, Supp A:143-148
- Rabinowitz M, (1973) Protein synthesis and turnover in normal and hypertrophied heart. *Am J Cardiol* 31:202-210
- Rabinowitz M, (1974) Overview on pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Circ Res Supp* 11.34/35:3-11
- Rabinowitz M, Zak R, (1972) Biochemical and cellular changes in cardiac hypertrophy. *Annu Rev Med* 23:245-262
- Rabinowitz M, Zak R, (1975) Mitochondria and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 36:367-376
- Raina A, Janne J, (1975) Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. *Med Biol* 53(3) 121-147
- Riecker G, (1982) *Klinische Kardiologie*, 2.Aufl. Springer, Berlin New York
- Rushkoaho H, (1984) Prevention of cardiac hypertrophy by long-term treatment with isosorbide dinitrate and prazosin but not by minoxidil in spontaneously hypertensive rats. *Acta Pharmacol Toxicol* 54:154
- Sandritter W, (1977) Wie das Herz Muskelmasse auf- und abbaut. In: 8th Intern Meeting Study Group for Research in Cardiac Metabolism, Tokio
- Sanford C, Griffith E, Wildenthal K, (1978) Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res* 43:688-694

- Sanger F, (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. Biosci Rep 1:3-18
- Schatz G, Böhm P, Gasser S, Lwein A, Suissa M, (1981) Import of proteins into mitochondria. Biochem Soc Trans 9:52
- Scherrer K, Raynaud C, Therwath A, (1979) On pre-messenger RNA and transcriptions. A review. Molec Biol Rep 5:1-2, p 5-28
- Schlant R, Felner J, Blumenstein B, Wollam G, (1982) Echocardiographic documentation of regression of left ventricular hypertrophy in patient treated for essential hypertension. Eur Heart J Suppl A:171
- Schreiber S, Klein I, Oratz M, Rothschild M (1971) Adenyl cyclase activity and cyclic AMP in acute cardiac overload: a method for measuring cyclic AMP production based on ATP specific activity. J Mol Cell Cardiol 2:55-65
- Schreiber S, Oratz M, Rothschild M, (1968) Effect of acute overload on cardiac muscle mRNA. Am J Cardiol Vol 215:1250-1259
- Scornik O, (1974) In vivo rate of translation by ribosome of normal and regenerating liver. J Biol Chem 249:3867-3883
- Sen S, Tarazi R, Bumpus F, (1977) Cardiac hypertrophy and hypertensive therapy. Cardiovasc Res 11:427-433
- Sen S, Bumpus F, (1979) Collagen synthesis in development and reversal of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Am J Cardiol 44:954-958
- Sen S, (1983) Regression of cardiac hypertrophy. Am J Med 75:87-93
- Sharma J, Fernandez P, Kim B, Idiko H, Triggle C, (1983) Cardiac regression and blood pressure control in the dahl rat treated with either enalapril maleate, an angiotensin converting enzyme inhibitor, or hydrochlorothiazide. J Hypertension 1:251-256
- Sonotani N, Kubo S, Nishioka A, Takatsu T (1981) Elektrocardiographic changes after one to two-years treatment of hypertension. Jpn Heart J 22:325-333
- Stevenin J, Jacob M, (1979) Structure of pre-mRNP. Models and pitfalls. Molec Biol Rep 5:29-35
- Strauer B, (1983) Das Hochdruckherz. Springer Berlin New York
- Strauer B, Motz W, Bürger S, (1983) Myocardial and metabolic consequences — development and regression of cardiac hypertrophy in chronic heart disease. Persp in Cardiovasc Res Vol 7:653-671

- Strauer B, Motz W, Ringsgwardl G, Motz U, Bayer F, (1983) Herhypertrophie und Ventrikelfunktion unter chronischer Nifedipin-Behandlung. In: Neuere Entwicklungen in der Hochdrucktherapie. Eds. Distler A, Philipp Th, Schattauer Stuttgart New York
- Suzuki T (1975) RNA content in the heart muscle cells following adrenalectomy and additional overload in the rat. *Tohoku J Exp Med* 115:239
- Szakacs JE, Mehman B, (1960) Pathologic changes induced by 1-norepinephrine: quantitative aspects. *Am J Cardiol* 5:619-627
- Tarazi R, Sen S, Saragoga M, Kairallah P, (1982) The multifactorial role of catecholamines in hypertensive cardiac hypertrophy. *Eur Heart J* 3 Suppl A, 103-110
- Tarazi R, (1983) Regression of left ventricular hypertrophy by medical treatment: Present status and possible implications. *Am J Med* 75:80
- Tomanek R, Davis J, Anderson S, (1979) The effects of alpha-methyldopa on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: ultrastructural, stereological and morphometric analysis. *Cardiovasc Res* 13:173-182
- Watson J, Crick F, (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171:737-738
- White P, Smithwick R, Mathews M, Evans E, (1945) Electrocardiogram in hypertension:II. The effect of radical lumbar sympathectomy. *Am Heart J* 30:165-188
- Wicker P, Tarazi R, Kobayashi K (1983) Coronary blood flow during the development and regression of left ventricular hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Am J Cardiol* 51:1744-1749
- Wiener J, Filiberto G, Alden L, Anversa P, (1979) Morphometry of cardiac hypertrophy induced by experimental renal hypertension. *Am J Cardiol* Vol 44:919-929
- Wiegand V, Stroh E, Hennekes H, Kreuzer H, (1982) Myosinisoenzyme im normalen und hypertrophierten menschlichen Myokard. *Z Kardiol* 71:213
- Wollam G, Hall W, Porter V, Douglas M, Unger D, Blumenstein B, (1983) Time course of regression of left ventricular hypertrophy in treated hypertensive patients. *Am J Med* 75:100-110
- Woo S, Rosen J, et al. (1975) Physical and chemical characterization of purified ovalbumin mRNA. *J Biol Chem* 250:7027-7039

- Yamori Y, Tarazi R, Ooshima A (1980) Effect of β -receptor-blocking agents on cardiovascular structural changes in spontaneous and noradrenaline-induced hypertension in rats. *Clin Sci* 59:457-460
- Zähringer J, Höfling B, Raum W, Kandolf R (1980) Effect of adriamycin on the polyribosome and mRNA content of rat heart muscle. *Biochem Biophys Acta* 608:315-323
- Zähringer J, Höfling B (1980) Adriamycin cardiomyopathy: changes in myocardial polyribosome and mRNA levels. In Bolte H (ed) *Myocardial Biopsy*. Springer Berlin New York
- Zähringer J, Kandolf R (1980) Isolation, subcellular distribution and in vitro translation of myocardial mRNA and polyribosomes. *Circulation Suppl III* 62:114
- Zähringer J (1981) Genexpression und Proteinsynthese im normalen Herzmuskel und bei der Adriamycin-Kardiomyopathie. Habilitationsschrift Ludwig-Maximilians-Universität München
- Zähringer J, Raum W, Kandolf R, Troesch G, Stüb G, Jäger E (1981) Isolation and characterisation of structurally and functionally intact polyribosomes and mRNA from rat heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 13:127-146
- Zähringer J, Pritzl N, Stüb G (1982) Quantitation of cardiac polysomal mRNA by hybridization to (^3H)Poly(U). *J Mol Cell Cardiol* 14:539-550
- Zähringer J, Klaubert A (1982) The effect of triiodothyronine on the cardiac mRNA. *J Mol Cell Cardiol* 14:559-571
- Zähringer J, Pritzl N (1983) Quantitation of Poly(A) containing mRNA in rat cardiac biopsies. *Basic Res Cardiol* 78:203-209
- Zähringer J, Klaubert A, Pritzl N, Stangl E, Kreuzer E (1984) Gene expression in cardiac hypertrophy in rat and in human heart muscle. *Eur Heart J* 5 Suppl F:199-210
- Zähringer J (1984) Die Regulation der Proteinsynthese am normalen Herzen und unter pathologischen Bedingungen. In: *Hdb. Inn Med Bd IX/4* Springer
- Zähringer J, Pritzl N, Stüb G, Kreuzer E (1985) Quantitation of cardiac mRNA in heart muscle biopsies. *Adv Myocardiol Vol 6*:285-295
- Zähringer J, Stangl E, Danninger B, Motz W, Strauer B (1985) Regression of heart muscle hypertrophy after Nifedipin-Therapy: changes in cardiac gene expression. *J Hypertension + Ric Sci Ed Perm Suppl* 49:585
- Zähringer J (1985) Biochemische Veränderungen bei Herzmuskelhypertrophie-Regression. *Z Kardiol* 74, Suppl 1:1-8

- Zak R, Martin A, Blough R (1979) Assessment of protein turnover by use of radioisotopic tracers. *Physiol Rev* 59:407-447
- Zak R, Rabinowitz M (1979) Molecular Aspekts of cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 41:539-552
- Zimmer H, Steinkopff G, Ibel H, Koschine H (1980) Is the ATP decline a signal for stimulating protein synthesis in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy? *J Mol Cell Cardiol* 12:421-426

In der vorliegenden Arbeit nicht zitierte Literaturstellen, die eine Einführung in die behandelte Thematik geben:

- Fanburg B, Posner B (1968) Ribonucleic acid synthesis in experimental cardiac hypertrophy in rats. I. Characterisation and kinetics of labeling. II. Aspects of regulation. *Circ Res* Vol 13
- Fleckenstein A (1961) Wirkungsmechanismen und Angriffspunkte von Calcium-Antagonisten am Myokard und an kardialen Automatiezentren. (In: Roskamm Reindell (Eds) *Herzkrankheiten* Springer Heidelberg New York
- Grove D, Zak R, Nair K, Aschenbrenner V, (1969) Biochemical correlates of cardiac hypertrophy: I. changes in heart weight, RNA content and nuclear RNase activity. II. changes in DNA content, polyploidy and mitotic activity. III. cellular organisation of growth. *Circul Res* 25
- Krayenbühl HP, (1982) Ist die sekundäre Myokardhypertrophie ein physiologischer oder ein pathologischer Adaptationsmechanismus? *Z Kardiol* 71:489-496
- Sloan P, Beevers D, (1983) Hypertension and the heart. A review. *Europ Heart J* 4:215-222
- Zak R, (Ed) (1984) Growth of the heart in health and disease. Raven Press New York
- Zak R, (1983) Growth characteristics of cardiac hypertrophy. *Persp Cardiovasc Res* Vol 8

VI. LEBENSLAUF

Geboren am 12. Juli 1961 in München

Eltern: Viktoria und Erich Danninger, Ingenieur

1967 - 1980: Besuch des städt. Käthe-Kollwitz-Gymnasiums, München

1980: Abitur und Beginn des Medizin-Studiums an der
 Ludwig-Maximilians-Universität in München

August 1982: Physikum

August 1983: I. Staatsexamen

Oktob. 1983: Eintritt in die Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz.

Dr. med. J. Zähringer; Arbeiten über:

- Kinetik der Proteinsynthese im Myokard post mortem
unter Einfluß der Umgebungstemperatur;
- Veränderung der myokardialen Genexpression bei Herz-
muskelhypertrophie-Regression unter antihypertensi-
ver Therapie mit Urapidil und Nifedipin

April 1985 : über dieses Thema Vortrag vor der Deutschen Gesellschaft
für Herz- und Kreislaufforschung in Mannheim

August 1985: II. Staatsexamen

VII. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	complementäre DNS
CPK	Creatinphosphokinase
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-Äthansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MHK	Myosin-II-Kette
Poly(A)	Poly(adenylat)
Poly(U)	Poly(uridylat)
POPOP	2,2'-p-Phenylene-bis(5-phenyloxazol)
pm	post mortem
RNS	Ribonukleinsäure
hnRNS	heteronukleäre RNS
mRNS	Messenger-RNS
rRNS	Ribosomale RNS
tRNS	Transfer-RNS
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfat
SA	Spezifische Aktivität
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan

ORIGINALABBILDUNGEN

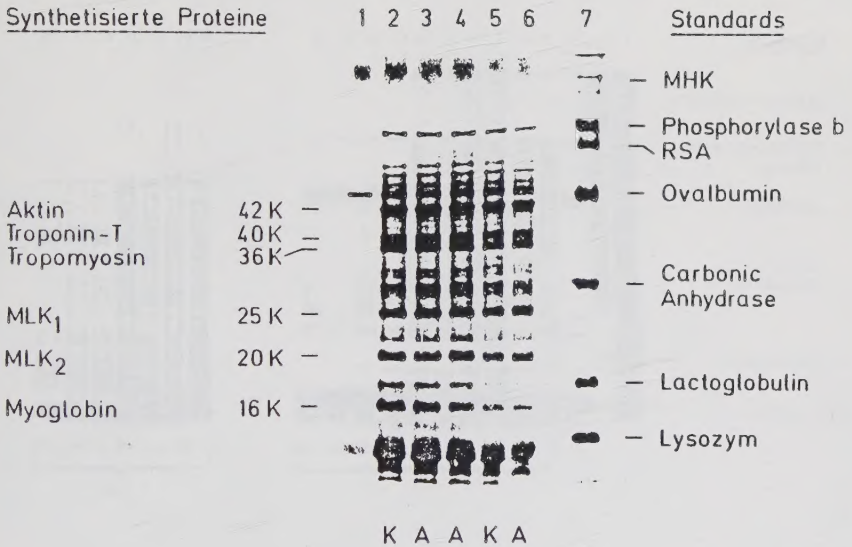


Abbildung 8: Identifizierung in vitro synthetisierter myokardialer Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Standard-Proteinen
 (Seite 42)

ORIGINALABBILDUNGEN

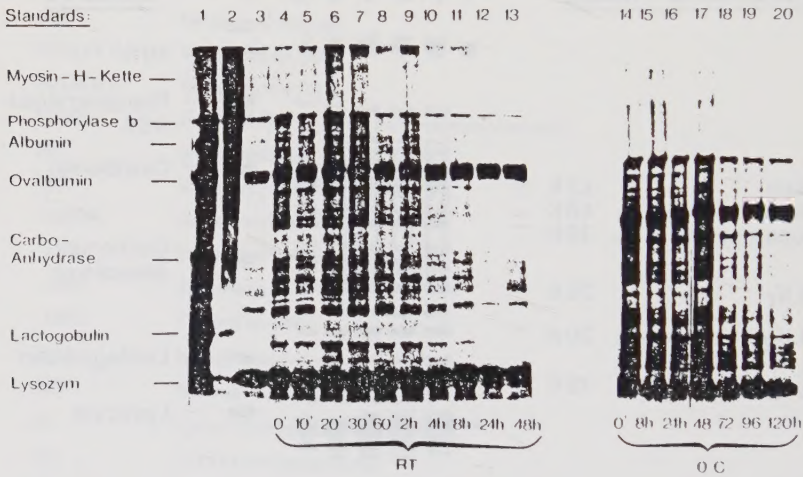


Abbildung 9: Darstellung der neusynthetisierten myokardialen Proteine aus den zu angegebenen Zeiten post mortem isolierten mRNS-Präparationen (Seite 43)

